

# Therapie der experimentellen Arthritis mittels Plasmid-Inokulation

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Stefanie Knackstedt**  
geboren am 05. Januar 1979 in Braunschweig

3. Juni 2004

Gutachter 1: PD Dr. A. Henke

Gutachter 2: Prof. Dr. R. Bräuer

Gutachter 3: Prof. Dr. J. Kriegsmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. Dezember 2005

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG .....	3
2.1 Einführung.....	3
2.2 Rheumatoide Arthritis.....	4
2.3 Zytokine.....	8
2.3.1 Interleukin-4.....	9
2.3.2 Interleukin-10.....	11
2.4 Antigen-induzierte Arthritis .....	12
2.5 Plasmidkonstrukte .....	13
3. ZIELE DER ARBEIT .....	15
4. MATERIAL UND METHODEN .....	17
4.1 Material.....	17
4.1.1 Geräte .....	17
4.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	18
4.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	18
4.1.3.1 Reagenzien .....	18
4.1.3.2 Verwendete Kulturmedien und Lösungen.....	24
4.2 Methoden .....	26
4.2.1 Klonierung der Plasmide .....	26
4.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien .....	26
4.2.1.2 Transformation von TG1-Zellen.....	27
4.2.1.3 Plasmidisolierung .....	27
4.2.1.4 Vorbereitung für eine Ligation.....	27
4.2.1.5 Ligation .....	28
4.2.1.6 Überprüfung der Ligation.....	29

4.2.1.7 Herstellung des bicistronischen Plasmids.....	29
4.2.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	30
4.2.1.9 Sequenzierung .....	32
4.2.2 In-vitro-Transfektion .....	33
4.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Plasmids .....	34
4.2.2.2 Nachweis der Zytokinexpression durch RNA-Isolierung.....	34
4.2.2.3 Nachweis der Zytokinexpression durch Proteinbestimmung ....	36
4.2.3 In-vivo-Versuche .....	37
4.2.3.1 Tiere und Haltungsbedingungen.....	37
4.2.3.2 Vorversuche .....	37
4.2.3.3 Antigen-induzierte Arthritis.....	38
4.2.3.4 DTH-Reaktion.....	39
4.2.3.5 Makrophagenfunktionstest.....	39
4.2.3.6 Bestimmung der Immunglobulin-Konzentrationen im Serum....	40
4.2.3.7 Histologische Auswertung der Entzündung im Kniegelenk.....	41
4.2.3.8 Transfektion von Makrophagen .....	42
4.2.3.9 Statistische Auswertung .....	42
5. ERGEBNISSE .....	44
5.1 Herstellung der Plasmidkonstrukte.....	44
5.2 In-vitro-Transfektion .....	45
5.3 Reportergenexpression nach In-vivo-Transfektion .....	49
5.4 In-vivo-Versuche am Modell der AIA .....	51
5.4.1 Messung der Kniegelenkschwellung.....	51
5.4.2 Gewichtsmessung.....	52
5.4.3 DTH-Reaktion .....	53
5.4.4 Histologische Auswertung.....	53
5.4.5 Arthritis-Score .....	56
5.4.6 Bestimmung der Immunglobulin-Konzentrationen im Serum .....	57
5.4.7 Makrophagenfunktionstest .....	59
5.5 In-vitro-Transfektion peritonealer Makrophagen.....	63
6. DISKUSSION .....	65
6.1 Gentechnische Verfahren.....	65

6.2 Plasmide in der Gentechnik.....	66
6.3 Versuche .....	67
6.3.1 Transfektionserfolg in vitro .....	67
6.3.2 Vorversuche in vivo.....	68
6.3.3 Versuche am Modell der AIA .....	69
6.3.3.1 Lokale Wirkungen.....	69
6.3.3.2 Systemische Wirkungen .....	71
6.4 Kombinationstherapie mit IL-4 und IL-10.....	75
6.5 Übertragung auf die RA.....	76
6.6 Nebenwirkungen einer Zytokintherapie .....	77
6.7 Schlussfolgerung.....	79
 7. LITERATURVERZEICHNIS.....	 81

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

**Abkürzungsverzeichnis:**

ACR	American College of Rheumatology
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvanz
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DTH	Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Effectene TR	Effectene Transfection Reagent
EGTA	Ehtylenglykol-bis(2 Aminoethylether)-Tetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay
F1 ori	F1 Ursprung
FKS	Fetales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSV	Herpes simplex Virus
HSV TK polyA	Herpes simplex virus Thymidinkinase Polyadenylierungsstelle
i.a.	Intraartikulär
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin vom Typ A
IgE	Immunglobulin vom Typ E
IgG	Immunglobulin vom Typ G
IgM	Immunglobulin vom Typ M
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
IRES	Internal Ribosome Entry Site

KI	Kollagen Typ I
KII	Kollagen Typ II
K <sub>D</sub>	Bindungskonstante
Kan	Kanamycin-Resistenz
LPS	Lipopolysaccharid
mBSA	Methyliertes Bovines Serumalbumin
MEM/E	Minimal Essential Medium (Eagles MEM)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloprotease
MTX	Methotrexat
NO	Stickstoffmonoxyd
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
OPD	Ortho-Phenylendiamin
P <sub>CMV</sub>	Promotor des Cytomegalievirus
P <sub>SV40</sub>	Promotor des SV40
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Proteoglykan
PGE2	Prostaglandin E2
PNPP	P-Nitrophenylphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
pUC ori	Replikationsursprung
RA	Rheumatoide Arthritis
RGD-TR	Jet PEI <sup>TM</sup> -RGD Cationic Polymer Transfection Reagent
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SCID	Schwere kombinierte Immunschwäche
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40 polyA	SV40 Polyadenylierungsstelle
Th1	T-Helferzellen vom Typ I
Th2	T-Helferzellen vom Typ II
TIMP	Tissue inhibitory factors of metalloproteinases
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## 1. Zusammenfassung der Arbeit

**Einleitung:** Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, deren Ursache nicht geklärt ist. Derzeit lässt sie sich medikamentös in ihrem Fortschreiten verlangsamen – aber nicht heilen. Neue therapeutische Methoden beschäftigen sich mit gentechnischen Ansätzen, bei denen der Applikation von Plasmiden große Bedeutung zukommt.

**Aufgabenstellung:** Anhand von In-vivo-Versuchen an Mäusen mit einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) wurde die Effektivität einer intraartikulären (i. a.) Plasmidinjektion hinsichtlich der Transfektionsrate und -dauer überprüft. Die Wirkungen der auf den Plasmiden kodierten Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10) auf die Entzündungsreaktion wurden untersucht und der therapeutische Effekt einer kombinierten Zytokinapplikation näher charakterisiert.

**Methoden:** Die Zytokine IL-4 und IL-10 wurden sowohl isoliert als auch gemeinsam in das Plasmid pIRES2 kloniert. Der Klonierungserfolg wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung der Plasmide sichergestellt. Verschiedene Zelllinien wurden mit den Plasmiden in vitro transfiziert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Expression des Reportergens Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) nachgewiesen, und durch mRNA-Isolierung wurde ein Zytokinnachweis durchgeführt. An 3T3-Fibroblasten wurde nach Transfektion mit pIRES2/IL-4/IL-10 im ELISA eine Zytokindetektion aus dem Zelllysat und dem Überstand transfizierter Zellen versucht. Es schlossen sich In-vivo-Versuche an, in denen pIRES2/EGFP sowie ein Kontrollvektor pCMV- $\beta$ , der das Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, Mäusen i. a. injiziert wurden. Die Detektion der Reportergene erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und mit Hilfe einer Spezialfärbung anhand von Gelenkschnitten. Es folgte ein Versuch am Modell der AIA, in dem eine Transfektion von Zellen mit pIRES2/IL-4/IL-10 gezeigt werden sollte. Als Parameter, mit deren Hilfe ein Einfluss der Zytokinapplikation bestimmt wurde, dienten hier die Gelenkschwellung und das Gewicht im Versuchsverlauf sowie am Tag 21 nach Arthritisinduktion die histologische Begutachtung der Gelenke, die Bestimmung der Serumimmunglobuline vom Typ G (IgG) und eine Aktivitätsmessung peritonealer Makrophagen anhand von Stimulationstests mit LPS und



IFN- $\gamma$ . Weiterhin wurde eine In-vitro-Transfektion peritonealer Makrophagen mit pIRES2/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 durchgeführt und mit Hilfe des ELISA die Zytokine IL-4 und IL-10 aus dem Zellüberstand nachgewiesen.

**Ergebnisse:** Der Klonierungserfolg wurde bestätigt. Im Verlauf der In vitro-Versuche wurde die erfolgreiche Transfektion von 293-Zellen und 3T3-Fibroblasten mit pIRES2/IL-4/EGFP und pIRES2/IL-10/EGFP durch den Nachweis von EGFP sichergestellt. Für alle drei Plasmide wurde die Transkription von IL-4 und IL-10 nachgewiesen. Die Transfektionsrate der Fibroblasten war dabei sehr gering. Eine Detektion von IL-4 und IL-10 im Überstand der Zellen sowie aus dem Zelllysat gelang nicht. Es folgten Versuche an Mäusen, in denen nach i. a.-Injektion von pIRES2/EGFP und pCMV- $\beta$  die  $\beta$ -Galaktosidase an den Tagen 5 und 7 nach der Plasmidapplikation nachweisbar war. In Versuchen am Modell der AIA zeigten sich bezüglich der lokalen und systemischen Parameter der AIA zwischen den Negativkontrollen und der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe nur geringfügige Unterschiede.

**Diskussion:** Nach In-vitro-Transfektion von Zellen erfolgte die Reporterexpression. Die Intaktheit der Plasmid-DNA war somit sichergestellt. Die Transkribierbarkeit aller klonierten Plasmide wurde gezeigt. Der Zytokinnachweis mittels ELISA gelang nach Transfektion der Fibroblasten mit pIRES2/IL-4/IL-10 nicht. Eine mögliche Ursache dafür waren die geringe Transfektionsrate der Zellen oder eine zu geringe Menge aufgenommener Plasmid-DNA. Es konnte eine In-vivo-Transfektion von Zellen mit geringer Transfektionsrate nach i. a.-Injektion gezeigt werden. Aus den Versuchen am Modell der AIA ergaben sich keine sicheren Zeichen für den Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-10 auf die Entzündung. Allerdings zeigte sich hier eine mögliche Verstärkung der arthritischen Symptomatik durch die applizierten Zytokine. Die systemische Wirkung der beiden Zytokine auf den Immunstatus der Tiere ließ in diesem Versuch ebenfalls nur Tendenzen erkennen, die auf eine verringerte Aktivität der Makrophagen hinweisen. Die Bestimmung der spezifischen Immunglobuline der AIA zeigte keinerlei Veränderungen im Muster der IgG-Subklassen. Möglicherweise wäre ein deutlicherer Effekt auf die AIA sichtbar gewesen, wenn eine größere Menge an Plasmid-DNA in den Gelenkspalt injiziert worden wäre. Eine Aussage über die Effizienz einer i. a.-Plasmidinjektion sowie über die Effektivität der kombinierten Zytokinapplikation lässt sich anhand dieser Versuche bislang nicht eindeutig treffen.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Einführung**

Die RA zählt zum Formenkreis der rheumatischen Erkrankungen. Die Prävalenz liegt bei 0,5 bis 1 % (Gabriel 2001). Kennzeichen der RA sind entzündliche Veränderungen insbesondere im Bereich der Gelenke und der periartikulären Weichteile, die zu weitgehendem Funktionsverlust und Fehlstellungen der betroffenen Gelenke führen. Während die Ursachen für diese Entzündungsreaktionen bisher weitgehend unklar sind, konnte auf der Basis zahlreicher Studien ein pathogenetisches Modell aufgestellt werden. Im Mittelpunkt der Erkrankung stehen nach heutigen Erkenntnissen die T-Helferzellen vom Typ I (Th1), die zum einen über direkte Zellkontakte, zum anderen über spezifische proinflammatorische Zytokine auf die Zellen ihrer Umgebung einwirken und auf diese Weise die Entzündungsreaktion initiieren und unterhalten.

Für die Prognose der RA ist eine früh einsetzende Behandlung entscheidend. Die bisherigen medikamentösen Therapiemöglichkeiten für die RA umfassen vor allem die sogenannten Basistherapeutika wie Methotrexat (MTX) oder Goldverbindungen, deren Wirkmechanismus letztlich unbekannt ist. Sie verzögern das Fortschreiten der Gelenkdestruktion, ohne die Erkrankung jedoch heilen zu können. Neuere Substanzen, die Eingang in die Behandlung gefunden haben, greifen auf der Ebene der Zytokine inhibierend in das immunologische Geschehen ein. Mit solchen Substanzen sind bisher auch in der Klinik gute Ergebnisse hinsichtlich einer Milderung der rheumatischen Symptome erzielt worden (Abramson and Amin 2002). Der Ansatz, über eine Modulation des Zytokinmusters die Entzündungsreaktionen zu beeinflussen, erscheint somit erfolgversprechend.

Die Darbietung der Zytokine als Proteine erfordert allerdings aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Proteine im Organismus eine häufig wiederholte parenterale Gabe (Bresnihan et al. 1998, Weisman et al. 2003). Eine Möglichkeit für eine langfristige Therapie bietet der In-vivo-Gentransfer von Zytokinen. Als Vektoren, mit deren Hilfe die genetische Information der Zytokine in den Körper eingebracht wird, können Plasmide dienen. Diese sind äußerst stabil und lassen sich lokal oder auch systemisch in den Organis-

mus applizieren. Die auf dem Plasmid kodierten Zytokine werden nach der Plasmidaufnahme durch Zellen des umliegenden Gewebes exprimiert und anschließend auch sezerniert.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich eine Zytokinexpression mittels Plasmidinokulation für einen gentherapeutischen Ansatz der RA eignet. Die Plasmidkonstrukte, die hierzu angefertigt wurden, kodieren für die murinen Zytokine IL-4 und IL-10, für die es Indizien dafür gibt, dass sie als Zytokine der von T-Helferzellen des Typs II (Th2) vermittelten Immunreaktion inhibierend auf die Th1-gesteuerte Entzündungsreaktion bei der RA einwirken.

Folgende Methoden fanden in dieser Forschungsarbeit Anwendung: zunächst erfolgte eine In-vitro-Transfektion von Zellen mit den genannten Plasmidkonstrukten sowie der Nachweis einer Zytokinexpression. Anschließend wurden In-vivo-Versuche durchgeführt, in denen geklärt werden sollte, ob die Plasmide nach einer i. a.-Injektion in Zellen aufgenommen werden. In einem weiteren Schritt wurde am Modell der AIA, einem Tiermodell für die RA, die Wirkung einer Zytokinapplikation auf das entzündliche Geschehen im Kniegelenk überprüft.

## **2.2 Rheumatoide Arthritis**

Die RA ist eine chronische Systemerkrankung. Sie wird meist im Alter von 60 Jahren diagnostiziert, wobei Frauen 2 bis 3 mal häufiger betroffen sind als Männer (Gabriel et al. 1999). Neben allgemeinen Beschwerden stehen Veränderungen im Bereich der Gelenke, Sehnen und periartikulären Weichteile im Vordergrund. Das Amerikanische College für Rheumatologie (ACR) hat im Jahr 1987 bestimmte Kriterien definiert (Arnett et al. 1988), die für die Diagnose der RA erfüllt sein müssen (Tab. 1). Die Erstsymptome wie morgendliche Steifheit und Bewegungsschmerz beginnen zumeist symmetrisch an den kleinen Gelenken; dabei erscheinen die betroffenen Gelenke äußerlich geschwollen und gerötet. Das chronische Stadium der Erkrankung ist histologisch in erster Linie durch eine proliferative Synovialitis mit einem entzündlichen Infiltrat aus Makrophagen (Yanni et al. 1994) und Lymphozyten gekennzeichnet (Edwards und Hallett 1997).

**Tab. 1. ACR-Kriterien für die Diagnose einer RA:**

- Länger als 6 Wochen andauernde Morgensteifigkeit der Gelenke für mindestens 1 Stunde
- Länger als 6 Wochen andauernde Gelenkschwellung in mindestens 3 Gelenken gleichzeitig
- Länger als 6 Wochen andauernde Schwellung der Handgelenke, Metakarpalgelenke oder proximalen Interphalangealgelenke
- Rheumaknoten
- erhöhte Rheumafaktoren im Serum
- Röntgenologisch feststellbare typisch rheumatoide Gelenkveränderungen der Handgelenke und Hände

Bei Erwachsenen über 18 Jahren müssen mindestens 4 der 7 Kriterien erfüllen, wenn die Diagnose RA gestellt wird.

Dabei besteht das lymphozytäre Infiltrat zu 80 % aus T-Zellen, von denen etwa 40 % den T-Helferzellen zugeordnet werden können (Kinne et al. 1997). Die Folge dieser Infiltrierung ist eine weitgehende Gelenkzerstörung durch proteolytische Enzyme sowie eine granulierende Entzündung mit Verdickung der Synovia. Dieses als Pannus bezeichnete Gewebe ist maßgeblich für die Schädigung des umliegenden Gewebes verantwortlich (Gay et al. 1993). Die Abb. 1 zeigt eine schematische Übersicht über die wichtigsten Mechanismen, die für die Entstehung der RA bedeutsam sind.

Die Ursachen der Entzündungsreaktion sind noch weitgehend unklar. Nach heutiger Kenntnislage sind Personen mit den Histokompatibilitäts-Allelen HLA-DR1 (Auger und Roudier 1997), -DR4 (Ronnelid et al. 1994) oder -DQ (Zanelli et al. 1995) einem erhöhten Erkrankungsrisiko ausgesetzt. Möglicherweise hat auch das Auftreten bestimmter Allele im Bereich des Interleukin 1 (IL-1) Genclusters Einfluss auf die Entwicklung einer RA (Barrera et al. 2001). Hinsichtlich der Schwere des Erkrankungsbildes und den extraartikulären Manifestationen lässt sich eine Korrelation mit der Konzentration der

sogenannten Rheumafaktoren, Immunglobuline vom Typ M (IgM) gegen das Fc-Fragment von IgG, feststellen.

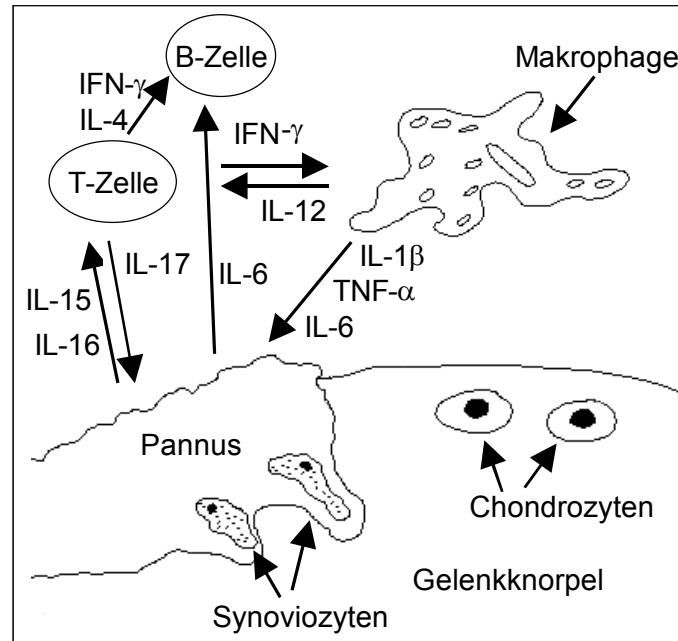


Abb. 1. Schematische Darstellung der Pathogenese der RA. Der Gelenkspalt ist von immun-kompetente Zellen wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen infiltriert. Diese treten untereinander sowie mit den Synoviozyten direkt über Zellkontakte und indirekt über die Sekretion von Zytokinen in Kontakt und setzen Chemokine und destruierende Proteasen frei. Die Makrophagen stimulieren durch das IL-12 die Differenzierung der Th-Zellen zu Th1-Zellen. Diese stehen im Zentrum der Entzündungsreaktion und lenken über verschiedenartige Zytokine die Immunreaktion in ein Th1-Muster. Die synovialen Fibroblasten sezernieren dabei ebenfalls Zytokine wie das chemotaktisch wirkende IL-16 und sind maßgeblich an der Freisetzung von knorpeldegradierenden Enzymen beteiligt. Die Folge dieser Reaktionen ist eine Invasion des Knorpels durch das sogenannte Pannusgewebe und ein Knochenabbau durch die Aktivierung von Osteoklasten.

Bei der Prognose der RA ist eine früh einsetzende Therapie entscheidend (Egsmose et al. 1995, van der Heide et al. 1996). Neben den physio- und ergotherapeutischen Maßnahmen stehen die nichtsteroidalen antientzündlichen Medikamente sowie die sogenannten Basistherapeutika im Vordergrund, zu denen MTX, Sulfasalazin, Hydroxychloroquin, D-Penicillamin, Azathioprin und Goldverbindungen zählen (Wilske und Healey 1989). Die therapeutischen Möglichkeiten sind allerdings durch die häufigen Therapieabbrüche aufgrund des langsamen Wirkungseintritts sowie der häufigen unerwünschten

Effekte der Medikamente stark eingeschränkt (Wolfe et al. 1990). Für MTX und Sulfasalazin konnte allerdings ein relativ günstiges Verhältnis ihrer Effektivität gegenüber toxischen Nebenwirkungen bestätigt werden (van Jaarsveld et al. 2000). Eine Einschätzung der Effektivität einer Therapie erlaubt die vom ACR eingeführte Definition über die Verbesserung der Symptomatik der RA. Hier fließen die subjektiven und objektiven Bewertungen über die Schwere der RA, die Schmerzen sowie labordiagnostische Parameter eines Patienten mit RA in einen Score ein. In prozentualen Anteilen kann so die Schwere der RA im Vergleich zum Ausgangszustand vor der Therapie ermittelt werden. Ein ACR20 zeigt somit eine Verbesserung der Symptome um 20 % auf.

Durch die Erkrankung an sich sowie durch die Komplikationen einer medikamentösen Therapie der RA ist die Lebenserwartung der Patienten um 15 bis 30 % eingeschränkt (Reilly et al. 1990, Myllykangas-Luosujarvi et al. 1995). Aus diesen Daten wird deutlich, wie wichtig die Suche nach effektiveren Therapiemaßnahmen ist. Neuere Therapieansätze basieren zum einen auf der Applikation von Zytokinen oder von Antikörpern gegen Zytokine (Lorenz und Kalden 2001), zum anderen auf dem Gentransfer von Zytokinen, die die Entzündungsreaktion modulieren (Bessis et al. 2002).

Verantwortlich für die Gelenkzerstörung sind insbesondere die entzündlichen Veränderungen. Die Forschungen der letzten Jahre konzentrieren sich darauf, die zugrundeliegenden Pathomechanismen und biochemischen Abläufe zu erklären sowie Möglichkeiten der Beeinflussung derselben durch Veränderung des Zytokinmusters zu untersuchen. Dabei ist entscheidend, dass die überschießende Entzündungsreaktion in den Gelenken eine Th1-Immunreaktion ist (Quayle et al. 1993). Dieses Th1/Th2-Ungleichgewicht bei der RA konnte auch in Tiermodellen wie der AIA nachgewiesen werden (Simon 2000). Die Th1-Zellen produzieren hauptsächlich die Zytokine Interferon-gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), IL-2 und Tumor-Nekrosefaktor-alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ) und stimulieren die Produktion der Immunglobulin-Subklassen IgG2a und IgG2b durch B-Zellen. Darüber hinaus sind sie für die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) verantwortlich. Durch die Zytokine  $\text{IFN-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$  werden Makrophagen zur Sekretion von IL-1, IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$  stimuliert. Auch die Synoviozyten vom Typ A weisen makrophagenähnliche zelluläre Merkmale auf und sind in der Lage,  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  zu sezernieren. Darüber hinaus haben sie eine hohe proliferative Aktivität und setzen proteolytische Enzyme wie Matrix-

Metalloproteasen (MMP) und Stickstoffmonoxyd (NO) frei, die zur Schädigung des umliegenden Gewebes beitragen (Mentzel und Bräuer 1998).

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass insbesondere TNF- $\alpha$  und IL-1 Hauptmediatoren für die Entzündungsprozesse sind (Arend und Dayer 1995), wobei die Knorpel- und Knochendestruktion hauptsächlich über das IL-1 vermittelt wird (Pettipher und Blake 1986, Goldring 2003). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde die Wirksamkeit von Stoffen, die die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 direkt antagonisieren, sowohl in vitro als auch in vivo untersucht. Aufgrund ihres therapeutischen Nutzens haben diese Substanzen bereits Einzug in die Klinik erhalten. Solche Antikörper gegen TNF- $\alpha$  oder IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-RA) werden parenteral appliziert und vermindern die Symptome der RA im Gegensatz zu Placebo-Präparaten deutlich (Moreland et al. 1999). Allerdings ist derzeit noch nicht vollständig geklärt, ob eine solche Therapie nachteilige Auswirkungen wie ein erhöhtes Infektionsrisiko oder die Entwicklung von Malignomen hat (Bencsath et al. 2003).

Eine weitere Therapiemöglichkeit bietet die funktionelle Antagonisierung der Th1-Entzündungsreaktion durch eine Stimulation der Th2-Zellen. Diese sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und vermitteln darüber hinaus einen Immunglobulinklassen-Switch von IgG1 zu Immunglobulin des Typs E (IgE). Der funktionelle Antagonismus der beiden Immunreaktionen wird über die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 vermittelt. Diese gegenseitige Inhibition könnte für eine Therapie der RA genutzt werden. Insbesondere IL-4 und IL-10 werden hinsichtlich ihrer Funktion als Gegenspieler zu TNF- $\alpha$  und IL-1 überprüft (Apparailly et al. 1998, Lubberts et al. 1999, Miyata et al. 2000).

## **2.3 Zytokine**

Der Begriff Zytokine umfasst eine heterogene Gruppe von Proteinen, die Kontroll- und Regulierungsfunktionen in Bezug auf Entzündung und Immunabwehr sowie hinsichtlich der Reaktion auf Schädigungen des Organismus ausüben und auch die Hämatopoese beeinflussen. Die Ursprünge der Zytokinforschung liegen in den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, in denen erstmalig Proteinmediatoren nachgewiesen wer-

den konnten, die das Wachstum und die Funktion von Leukozyten regulieren (Rocklin et al. 1975, Isaacs und Lindenmann 1987).

Zu den Zytokinen zählen die Interferone, Interleukine, Kolonie-stimulierenden Faktoren und Tumor-Nekrosefaktoren (Vilcek und Le 1991). Charakteristischerweise sind Zytokine Polypeptide oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 30 kDa. Sie liegen überwiegend als Monomere, manchmal als Homo- oder Heterooligomere vor. Die bedarfsgerechte Regulierung ihrer Produktion erfolgt sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation. Zytokinwirkungen sind jeweils sehr kurzzeitig und zumeist auto- oder parakrin. Sie binden mit einer sehr hohen Affinität an Oberflächenrezeptoren mit Bindungskonstanten in Größenordnungen von  $K_D$   $10^{-9}$ - $10^{-10}$  M (Vilcek und Le 1991). In den Zielzellen wird über G-Proteine oder tyrosinspezifische Proteinkinasen und unterschiedliche sich daran anschließende Signalwege das Genexpressionsmuster, die Proliferationsrate oder auch der Differenzierungsstatus der Zelle beeinflusst. Die einzelnen Zytokine üben funktionell synergistische, additive oder auch antagonistische Wirkungen aus, wobei Redundanz und Pleiotropie charakteristisch sind (Le und Vilcek 1987). Eine Aktivitätsänderung der Zielzelle stellt daher das Resultat der Bindung verschiedener Zytokine dar. Das bedeutet gleichfalls, dass auch subeffektive Zytokinkonzentrationen in Anwesenheit anderer Zytokine einen biologischen Effekt hervorrufen können.

In dieser Arbeit wurden murine Interleukine verwendet. Das humane und murine IL-4 sind in ihrer Nucleotidsequenz zu ca. 70 % identisch. Trotz dieser Ähnlichkeit sind weder humane Zellen in der Lage, murines IL-4 zu binden, noch umgekehrt (Pritchard et al. 1991). Das murine IL-10 weist zu dem humanen eine Identität von 72 % auf und besitzt hinsichtlich der biochemischen Struktur geringfügige Unterschiede. Auf humanen Zellen ist es inaktiv. Der murine Rezeptor hingegen ist in der Lage, neben dem murinen Interleukin auch das humane zu binden (Moore et al. 1990, Sprang und Bazan 1993).

### **2.3.1 Interleukin 4**

Das IL-4 ist 1982 erstmals als B-Zell-Wachstumsfaktor beschrieben worden (Lee et al. 1986). Es gehört zu den Zytokinen der Th2-Immunreaktion und übt im menschlichen



Organismus viele immunregulierende Funktionen aus (Paul 1991). Das humane IL-4 ist ein aus 129 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Gewicht von etwa 14 kDA, das von einer Vielzahl von Zellen produziert wird. Kodiert wird das IL-4 auf Chromosom 5 (Arai et al. 1989). Sein Rezeptor ist auf praktisch allen Zellen des Organismus zu finden. Man unterscheidet bei den IL-4-Rezeptoren zwei Typen, die beide zur Typ I Zytokin-Rezeptor-Superfamilie gehören (Bazan 1990) und über das Jak-Stat-System Signale in die Zielzelle weiterleiten (Chomarat und Banchereau 1997, Nelms et al. 1999, Gessner und Rollinghoff 2000). Die Wirkungen des IL-4 sind dementsprechend breitgefächert.

Im Folgenden werden vor allem die Effekte dargestellt, die im Zusammenhang mit den Untersuchungen dieser Arbeit relevant sind. In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass IL-4 die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-1 (Chomarat et al. 1995) und TNF- $\alpha$  inhibiert (Miossec et al. 1992) und somit eine Th1-gesteuerte Immunantwort in eine Th2-Reaktion umlenkt (Miossec und van den Berg 1997, Boyle et al. 1999). IL-4 hat insbesondere auf Monozyten eine hemmende Wirkung: zum einen wird deren Rekrutierung und Aktivität vermindert (Oswald 1992, Allen 1993, Jorgensen et al. 1998), zum anderen wird die Apoptoseinduktion in den Monozyten stimuliert (Mangan et al. 1992). Auf diese Weise wird eine für die Entzündungsreaktion zentrale Zelle in ihrer Funktion gehemmt. Bei der Betrachtung der Wirkungen des IL-4 auf die Matrixdegradation bei der RA wird ebenfalls der günstige Einfluss des Zytokins deutlich: die Aktivität der Osteoklasten wird gesenkt (Miossec et al. 1994) und die Synthese von MMPs durch Makrophagen inhibiert (Lacraz und Nicod 1992). Somit wird die Knorpel- und Knochendestruktion wesentlich vermindert (Jorgensen et al. 1998, Joosten et al. 1999). Allerdings wirkt das IL-4 auf Fibroblasten stimulierend (Monroe et al. 1988, Postlethwaite und Seyer 1991, Müller und Krahel 1997). Dies ist im Hinblick auf die RA insofern von Bedeutung, als viele Studien gezeigt haben, dass bei dieser Erkrankung den synovialen Fibroblasten eine entscheidende Rolle bei der Matrixdegeneration zukommt. Eine Proliferation dieser Zellen könnte sich daher negativ auf die Entwicklung der RA auswirken (Müller-Ladner et al. 1996, Tak und Bresnihan 2000).

### 2.3.2 Interleukin 10

Das IL-10 wurde in den achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts erstmals als Cytokine Synthesis Inhibitory Factor beschrieben (Fiorentino et al. 1989). Zu diesem Zeitpunkt war bekannt, dass es von den Th2-Zellen gebildet wird und sowohl die Aktivierung als auch die Zytokinproduktion der Th1-Zellen inhibiert. Die Forschungen der darauffolgenden Jahre konnten zum Verständnis der Funktionen und Wirkmechanismen dieses Interleukins im Organismus beitragen. Das humane IL-10 ist ein aus 178 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer  $\alpha$ -Helix-Struktur. Es ist 17-18 kDA schwer und liegt als Homodimer in zwei interpenetrierenden Polypeptidketten vor (Syto et al. 1998). Die genetische Information ist auf Chromosom 1 kodiert (Kim et al. 1992). Unterschiedliche Mechanismen regulieren – abhängig von der das Interleukin produzierenden Zelle – nach einem aktivierenden Stimulus die Genexpression. So spielen zum einen Transkriptionsfaktoren wie das Sp1 und Sp3 eine Rolle (Tone et al. 2000), zum anderen findet auch posttranskriptionell eine Kontrolle durch RNA-degradierende Mechanismen statt (Powell et al. 2000). Von besonderem Interesse ist auch die Promotor-Region für das IL-10, für die verschiedene Haplotypen bekannt sind. Ob eine Korrelation zwischen diesen Haplotypen und bestimmten Krankheiten wie der RA besteht, ist ungeklärt (Lazarus et al. 1997, Eskdale et al. 1998). Der Rezeptor für IL-10 gehört zu der Familie der IFN-Rezeptoren und besteht aus 2 Untereinheiten. Die erste Subunit, IL-10R1, ist ein 90-120 kDA schweres Molekül, das die Ligand-bindende Eigenschaft trägt, wobei die Bindung mit einer  $K_d$  von 35-200 pM erfolgt (Tan et al. 1993, Liu et al. 1994). Die zweite Subunit des Rezeptors, IL-10R2, hat akzessorische Funktion bei der Signalübertragung in der Effektorzelle (Kotenko et al. 1997). Über diese Signalwege ist bisher nur wenig bekannt. Vermutlich bewirken unterschiedliche Signalkaskaden, die in Abhängigkeit vom aktivierten Zelltyp differieren, die Verschiedenartigkeit der Zellantwort.

Das IL-10 hat eine pleiotrope Aktivität. So hat das IL-10 in Zellen myeloiden Ursprungs, wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, Einfluss auf die Zytokinexpression, auf die Ausschüttung löslicher Mediatoren sowie auf die Produktion von Oberflächenmolekülen. Dadurch moduliert es Entzündungsreaktionen. IL-10 inhibiert außerdem die Expression diverser Zytokine wie IL-1, IL-6 oder auch TNF- $\alpha$  (Fiorentino et al. 1991, Katsikis et al. 1994), denen eine zentrale Rolle im entzündlichen Geschehen der RA zukommt. Die verminderte Chemokinsynthese durch Monozyten bewirkt eine gerin-

gere Chemotaxis von Entzündungszellen (Seitz 1995, Kopydlowski et al. 1999). Die Hemmung der Produktion von Oberflächenmolekülen insbesondere auf Monozyten betrifft vor allem den Major Histocompatibility Complex II (MHCII), der die Antigenpräsentation vermittelt, sowie das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM1), sowie die kostimulatorischen Moleküle B7.1 und das B7.2, welche die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation initiieren (de Waal Malefyt et al. 1991, Ding und Shevach 1992). Die Interaktion des IL-10 mit B-Zellen bewirkt eine Verschiebung des Immunglobulinmusters. Es kommt zu einer verstärkten Produktion von IgM, IgG1-4, IgE und Immunglobulinen vom Typ A (IgA) (Nonoyama et al. 1993). Das IL-10 vermittelt darüber hinaus eine Knorpelprotektion, indem der Abbau der Knorpelgrundsubstanz vermindert wird (Lacraz 1995). Dies erfolgt durch Hemmung der Synthese des Prostaglandin E2 (PGE2), welches bei der Produktion von MMPs bedeutsam ist, sowie durch Förderung der Produktion von sogenannten Tissue inhibitory factors of metalloproteinases (TIMP), die als Inhibitoren der MMPs fungieren.

## **2.4 Antigen-induzierte Arthritis**

Die AIA ist ein etabliertes Modell der RA (Pettipher and Blake 1995). Sie wurde zuerst an Kaninchen beschrieben und später an das Mausmodell adaptiert (Brackertz et al. 1977). Die Versuchstiere werden mit einem in komplettem Freund'schen Adjuvanz (CFA) emulgierten Antigen immunisiert. Die Induktion der Arthritis erfolgt durch Injektion des Antigens in den Gelenkspalt.

Durch die Antigen-Injektion wird eine akute Entzündung ausgelöst, die in eine chronische Entzündungsphase übergeht. Der Schweregrad der Arthritis lässt sich durch eine Messung der Gelenkschwellung sowie durch semiquantitative Bewertung der histopathologischen Veränderungen der Entzündung und der Knorpelschäden einstufen. Diese Gelenkdestruktion sowie das Auftreten von Autoimmunreaktionen gegen verschiedene Knorpelbestandteile (Petrov et al. 1996) und anderer immunologischer Phänomene weisen eine starke Ähnlichkeit zur RA auf. Auch die Möglichkeit, einen akuten Entzündungsschub – die sogenannte Flare-up-Reaktion – zu initiieren (Buchner et al. 1995), und die zuverlässige Induktion der Arthritis zu einem gewählten Zeitpunkt sind weitere Vorteile der AIA.

## **2.5 Plasmidkonstrukte**

Für einen Gentransfer können Plasmide als Vektoren verwendet werden. Diese sind aus doppelsträngiger ringförmiger DNA aufgebaut, die aus Bakterien isoliert wurde. Ihre biologische Funktion ist der genetische Austausch zwischen Bakterien. Im Bereich der Gentechnik verwendete Plasmide können somit als Träger dienen, um ein bestimmtes Gen in Zellen zu applizieren. Zu diesem Zweck sind sie derart gestaltet, dass sie sowohl in Bakterien als auch in Säugetierzellen verwendet werden können. Mit Hilfe von Bakterien kann das Plasmid vermehrt werden. Dies wird durch den Selektionsdruck unterstützt, der auf dem Zusatz von Antibiotikum zum Zellmedium und auf dem Resistenzgen gegen das entsprechende Antibiotikum auf dem zu vermehrenden Plasmid beruht. Die mit dem Vektor transformierten Bakterien haben somit einen Anreiz, das Plasmid bei der Zellteilung zu replizieren. Somit steigt in der Kolonie mit der Zahl der Bakterien die der Plasmide exponentiell.

Plasmide wurden erstmals 1990 im Bereich des Gentransfers bei eukaryotischen Zellen eingesetzt (Wolff et al. 1990), nachdem nach einer intramuskulären (i. m.) Injektion nackter Plasmid-DNA in Mäuse die jeweils kodierten Reportergene für eine Dauer von etwa 2 Monaten nachweisbar waren. Inzwischen haben sich Plasmide als Träger für Fremd-DNA durch zahlreiche Studien etabliert (Miyata et al. 2000, Gill et al. 2001, Comerota et al. 2002).

Das hier verwendete Plasmid pIRES2/EGFP (Abb. 2) enthält einen Promotor des Cytomegalievirus (CMV). Diesem schließt sich eine multicloning site (MCS) an, in die Gene kloniert werden können. Der MCS folgt eine sogenannte internal ribosome entry site (IRES) des Encephalomyokarditis-Virus (ECMV). Diese liegt zwischen der MCS und einer für das EGFP kodierenden Region. Aufgrund der Position der IRES-Region ist es möglich, beide Gene, sowohl das in die MCS klonierte als auch das EGFP, von einer einzigen bicistronischen mRNA aus zu translatieren.

Dem EGFP schließt sich eine SV40-Polyadenylierung an, die für die Prozessierung des 3' Endes der mRNA benötigt wird; dieser Poly-A-Sequenz folgt ein f1-Origin für die Bildung von Einzelstrang-DNA in *Escherichia coli* (*E. coli*). Die Selektion nach Transfektion von *E. coli* ist gesichert durch eine Kanamycin-Resistenz, zu deren Kasette der

SV40-Promotor, das Kanamycin-Gen und das darauffolgende HSV-Thymidinkinase-Poly-A-Schema gehören. Daneben befinden sich auf dem Plasmid pIRES2/EGFP der SV40-Origin für die Replikation in Säugetierzellen und der pUC-Origin für die Propagation in *E. coli*.

Das Reportergen dieses Plasmids ist das EGFP, eine Variante des wild-type Green Fluorescent Protein, das in Bezug auf Fluoreszenz und Expression in Säugetierzellen optimiert wurde. Sein Exzitationsmaximum liegt bei 488 nm. Mit Hilfe seiner fluoreszierenden Eigenschaft ist die Detektion dieses Proteins in Zellen, die mit diesem Vektor transfiziert wurden, erleichtert und ermöglicht eine schnelle Aussage über den Erfolg einer Transfektion.

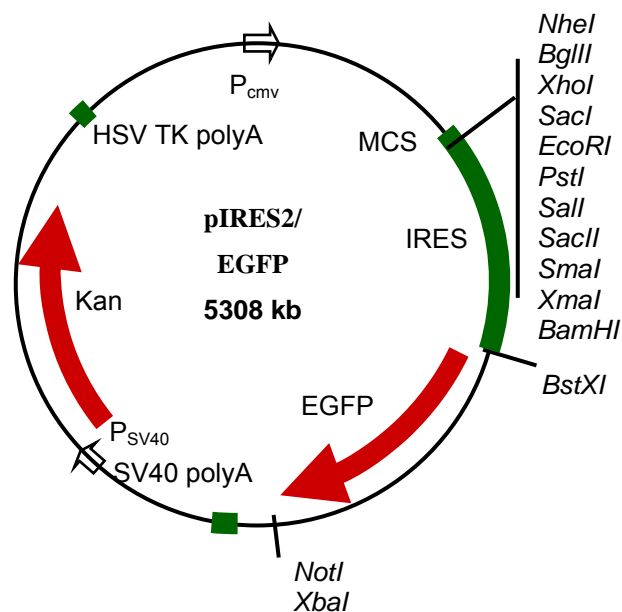


Abb.2. Darstellung des Ausgangsplasmids pIRES2/EGFP mit Angabe der Schnittstellen für die bei den Klonierungen verwendeten Restriktionsendonukleasen.

### 3. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage eines möglichen therapeutischen Ansatzes für die RA auf der Basis der Gentherapie. Das Ziel war es, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Expression der Zytokine IL-4 und IL-10 mittels Plasmidinokulation im Tiermodell der AIA einen therapeutischen Effekt hat. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die Art der Zytokinapplikation, die i. a.-Injektion nackter Plasmid-DNA, dazu geeignet ist, eine transiente Transfektion von Zellen im Bereich des Kniegelenkes zu erreichen, und wie die Nebenwirkungen einzuschätzen sind, die sich aus einer Plasmidinokulation ergeben.

Es sollten zunächst von einem Ausgangsplasmid drei neue Plasmidkonstrukte hergestellt werden, die das IL-4 und IL-10 jeweils einzeln bzw. gemeinsam kodieren. Der Klonierungserfolg wurde mit Hilfe von Restriktionsverdaus und Sequenzierungen sichergestellt.

Anschließend erfolgte die Überprüfung der Transkribierbarkeit der hergestellten Vektoren sowie des Ausgangsplasmids in vitro. Hierzu wurden sowohl unterschiedliche Zelllinien verwendet als auch drei Methoden der transienten Transfektion einander gegenübergestellt. Ziel dieser Variationen war es, eine Aussage darüber zu treffen, wie hoch die Transfektionsrate der einzelnen Zelllinien ist und welche Methode die höchste Rate erzielt. Um einen Anhaltspunkt dafür zu finden, dass nach i. a.-Injektion nackter Plasmid-DNA die Aufnahme der Vektoren durch synoviale Fibroblasten erfolgen kann, lag der Schwerpunkt dieser Betrachtungen auf dem Transfektionserfolg von murinen 3T3-Fibroblasten.

Der nächste Schritt umfasste eine In-vivo-Transfektion mit einem Plasmid, das als Reportergen das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob ein Plasmid nach einer i. a.-Injektion in das Kniegelenk einer Maus in Zellen aufgenommen wird und ob eine Transkription des Reportergens nachweisbar ist. Darüber hinaus sollte geklärt werden, in welchem Bereich und von welchen Zellen im Kniegelenk das Plasmid aufgenommen wird und wie die Transfektionsrate einzuschätzen ist.

Nach diesem Vorversuch wurde am Tiermodell der AIA an weiblichen C57Bl/6-Mäusen die i. a.-Injektion des Plasmids pIRES2/IL-4/IL-10 vorgenommen, um an diesem Modell einen therapeutischen Effekt der Zytokinapplikation zu untersuchen. Von besonderem Interesse war, ob die gemeinsame Applikation der Zytokine IL-4 und IL-10 synergistische Effekte hervorruft, wie aus anderen Studien (Lubberts et al. 1998) und der Kenntnis der Wirkungen beider Interleukine zu vermuten ist. Betrachtet wurden mögliche Effekte bis zu drei Wochen nach i. a.-Injektion des Plasmid. In dieser Zeit verschiebt sich die Entzündungsreaktion von der akuten in die chronische Phase. Es wurden unterschiedliche Parameter der Entzündungsreaktion bestimmt, zu denen neben der histologische Auswertung von Gelenkschnitten eine Bestimmung der Serumkonzentration von IgG-Subklassen sowie spezifischer Zytokine der Th1- und Th2-Immunreaktion gehörten. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch eine Quantifizierung der Aktivität peritonealer Makrophagen mit Hilfe von Stimulationstests. Auf diese Weise konnte die systemische Wirkung der lokalen Zytokinapplikation eingeschätzt werden. Weiterhin sollte durch die Applikation des Ausgangsplasmids in einer Kontrollgruppe überprüft werden, ob bereits die Injektion von Plasmid-DNA Nebenwirkungen wie etwa eine Verstärkung der Immunreaktion hervorruft.

## **4. Materialien und Methoden**

### **4.1 Materialien**

#### **4.1.1 Geräte**

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS GMBH

Begasungsbrutschrank Cellstar, NUNC

Brutschrank Function line, HERAEUS INSTRUMENTS

Elektrophorese Einheit GD251D, SEBIA

Elektrophorese Einheit 300xi, BIORAD

Enhanced analysis system E.A.S.Y. RH-3, HEROLAB

Fluoreszenz-Reader Fluostar Galaxy, BMG

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, FEINOPTIK

Gene pulser, FIRAM BIORAD

Inkubator, HERAEUS INSTRUMENTS

Inkubator shaker innova 4000, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC

Inverses Mikroskop Telaval 3, CARL ZEISS

Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen, EPPENDORF

Kryostat HM500M, MICROM LABORGERÄTE GMBH

Magnetic stirrer HI 303N, HANNA INSTRUMENTS

Mikroskop Axioskop 2, CARL ZEISS

PCR-Gerät PTC-200, BIOZYM

Pipettierhilfe Pipetboy, INTEGRA BIOSCIENCES

Pipettierhilfe; HIRSCMANN LABORGERÄTE

Präparationsbesteck, AESCULAP

Spectrophotometer UV-160A, SHIMADSU

Sterilbox SterilGARD Hood II, BAKER COMPANY

Thermoblock, LIEBISCH

Thermomixer 5436, EPPENDORF

Vakuumzentrifuge Concentrator 5301, EPPENDORF

Vortexgerät M82, IKA-LABORTECHNIK

Vortexgerät VF2,V, IKA-LABORTECHNIK



Vortexgerät VM 300, NEOLAB

Waschgerät Columbus, SLT LABINSTRUMENTS DEUTSCHLAND

Wasserbad mit Thermostat, JULABO

Zentrifuge 5402, EPPENDORF

Zentrifuge 5403, EPPENDORF

Zentrifuge 5415, EPPENDORF

Zentrifuge 5417c, EPPENDORF

Zentrifuge Juan CR312, JUAN

Zentrifuge Sigma 4K10, KENDRO LABORATORY PRODUCTS

#### **4.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Chamberslides, LAB TEC

Chamberslides, NUNC

Einmalspritzen und -kanülen, BRAUN-MELSUNGEN

Einmalfilter, 0,2 µm, steril, pyrogenfrei, SCHLEICHER&SCHÜLL

Einmalspritzen 10, 100, 1000 µl, sterilisiert, EPPENDORF

Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen, GREINER

Eppendorfbehälter, EPPENDORF

FACS-Röhrchen, FALCON

Gewebekulturflaschen, GREINER

Gewebekulturplatten 24 Well, 12 Well und 6 Well, GREINER

Mikrotiterplatten, hochbindend für ELISA, NUNC

Objektträger und Deckgläser, MENZEL

#### **4.1.3 Chemikalien und Reagenzien**

##### **4.1.3.1 Reagenzien**

Agarose, LIFE TECHNOLOGIES

Äther, HOECHST

Avidin, VECTOR

Azeton, J.T. BARKER

Biotin, VECTOR  
 Bordetella pertussis, hitzeinaktiviert, CHIVON BEHRING  
 Borsäure, J. T. BARKER  
 Bovines Serumalbumin (BSA), SIGMA  
 CaCl<sub>2</sub>, LABORCHEMIE  
 Chloroform, SIGMA  
 DEPC, FLUKA CHEMIE AG BUCHS  
 Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), LIFE TECHNOLOGIES  
 ddNTP, PROMEGA  
 DNaseI, ROCHE  
 dNTP, PROMEGA  
 Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), GIBCO BRL  
 Eosin, MERCK  
 Essigsäure, SIGMA  
 Ethanol, J. T. BARKER  
 Ethidiumbromid, SERVA,  
 Ethylendiamintetraacetat (EDTA), SERVA  
 Ehtylenglykol-bis(2 Aminoethylether)-Tetraessigsäure (EGTA), SIGMA  
 Fetales Kälberserum (FKS), PAA/GIBCO  
 Formalin, SIGMA  
 Gelatine, VEB LABORCHEMIKALIEN  
 Gentianaviolett, SIGMA  
 Glutamin, GIBCO  
 Glutaraldehyd, SIGMA  
 Glycerin, FERAK  
 Guanidinisothiocyanat, SIGMA  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MERCK  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, RIEDEL-DE-HAEN AG  
 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, FLUKA CHEMIE AG BUCHS  
 Hämatoxylin, FLUKA AG/MERCK  
 Hydroxyäthylpiperazin-2-äthylsulfonsäure, SERVA  
 Isopropanol, CARL ROTH GMBH + CO  
 Kalium-Ferricyanid, SIGMA  
 Kalium-Ferrocyanid, SIGMA

Kanamycin, BOEHRINGER MANNHEIM  
 KCl, LABORCHEMIE  
 Komplettes Freund'sches Adjuvanz mit 1 mg/ml Mycobacterium tuberculosis, SIGMA  
 Leupeptin, SIGMA  
 Liquemin N25000, ROCHE  
 Lipopolysaccharid (LPS), SIGMA  
 LB-Medium, SIGMA  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , MERCK  
 2-Mercaptoethanol, MERCK  
 MEM/E, SIGMA  
 Methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA), SIGMA  
 $\text{MgCl}_2$ , SIGMA  
 Mycobacterium tuberculosis, Stamm H37 RA, DIFCO  
 Natriumacetat, MERCK  
 NaCl, SERVA  
 N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid, FLUKA CHEMIE AG BUCHS  
 $\text{NaHCO}_3$ , RIEDEL-DE-HAEN AG  
 $\text{NaHPO}_4$ , LABORCHEMIE  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , SIGMA  
 NaOH, SIGMA  
 Natrium-Fluorid, SIGMA  
 Natriumkarbonatpuffer, SIGMA  
 Natriumphosphatpuffer, SIGMA  
 Natrium-Vanadat, SIGMA  
 Oligo-d(T), INSTITUT FÜR VIROLOGIE, FSU Jena  
 O-Phenylendiamin (OPD) Peroxidase Substrat, SIGMA  
 Paraformaldehyd, LABORCHEMIE  
 PCR-Synthesepuffer, HYBRIS AGS  
 Phenol, SIGMA  
 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), APPLICHEM  
 P-Nitrophenylphosphat (PNPP), ROCHE  
 Primer, INSTITUT FÜR VIROLOGIE, FSU Jena  
 Restriktionsendonukleasen, ROCHE  
 Reverse Transkriptase, ROCHE

RLT-Puffer, SIGMA  
 RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin, GIBCO  
 Smart Ladder, EUROGENTECH  
 Sodiumdodecylsulfat (SDS), SERVA  
 Sulfanilamid, FLUKA CHEMIE AG BUCHS  
 Streptavidin-PO, SERVA  
 TAQ-Polymerase, PROMEGA  
 T<sub>4</sub>-Ligase, ROCHE  
 Template Suppression Reagent, QIAGEN  
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), SERVA  
 Triton X 100, SERVA  
 Trypsin, SERVA  
 Tween 20, SIGMA  
 X-Gal-Färbelösung, BOEHRINGER MANNHEIM

**Tab. 2. Restriktionsendonukleasen**

BamHI, 10 U/μl	G↓GATCC	37 °C
BstXI, 10 U/μl	CCANNNNN↓NTGG	45 °C
EcoRI, 10 U/μl	G↓AATTC	37 °C
NotI, 10 U/μl	GC↓GGCCGC	37 °C
Sall, 10 U/μl	G↓TCGAC	37 °C
XhoI, 10 U/μl	C↓TCGAG	37 °C

**Verwendete Kits:**

Effectene Transfection Reagent, QIAGEN  
 Jet PEI<sup>TM</sup>-RGD Cationic Polymer Transfection Reagent, QBIOGENE, ALEXIS corp.  
 QIAamp DNA Mini-Kit, QIAGEN  
 Qiaquick PCR Purification Kit, QIAGEN  
 Qiaquick Gel Extraction Kit, QIAGEN  
 Rneasy Mini-Kit, QIAGEN  
 Plasmid Midi-Kit, QIAGEN

**Tab. 3. Primer**

Primer	Sequenz	Besonderheiten
F6834-33 5'	ATTGATAATCTCGAGATGGGTCT- CAACCCCCAG	XhoI-Schnittstelle enthalten
F6835-33 3'	ATTGATAATGAATTCCTACGAGT- AATCCATTTG	EcoRI-Schnittstelle enthalten
F6832-33 5'	ATTGATAATCTCGGATGCCTGGC- TCAGCACTG	XhoI-Schnittstelle enthalten
F6833-33 3'	ATTGATAATGGATCCTTAGCTTTT- TCATTTTGA	BamHI-Schnittstelle enthalten
F7368-39 5'	TTGCCACAACCTTGGATGCCTGG- CTCAGCACTGCTATGC	BstXI-Schnittstelle enthalten
F7369-33 3'	ACACGCGGCCGCTTAGCTTTTCA- TTTTGATCAT	NotI-Schnittstelle enthalten
F6916-21	ATTGACGCAAATGGGCGGTAG	5' Sequenzierung
Hu-β-Aktin 5'	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	
Hu-β-Aktin 3'	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

**Tab. 4. Anti-Maus-Antikörper für die ELISA-Bestimmung:**

Antikörper	Klon	Konzentration	Beladungspuffer	Quelle
IL-1β	MAB401	2 µg/ml	NaHCO <sub>3</sub> pH 9,5	R&D Wiesbaden
IL-1 β Biotin	BAF401	50 ng/ml		R&D Wiesbaden
IL-4	BVD4-1D11	2 µg/ml	NaHCO <sub>3</sub> pH 9,5	Becton Dickinson
IL-4 Biotin	BVD6-24G2	1 µg/ml		Becton Dickinson
IL-6	MP5-20F3	2 µg/ml	Na-CO pH 9,5	Becton Dickinson
IL-6 Biotin	MP5-32C11	0,25 ng/ml		Becton Dickinson

IL-10	(nicht angegeben)		Na-PP pH 6,5	OptEIA™ Sets, BD
IL-10 Biotin	(nicht angegeben)			OptEIA™ Sets, BD
IL-12	(nicht angegeben)			OptEIA™ Sets, BD
IL-12 Biotin	(nicht angegeben)			OptEIA™ Sets, BD
TNF- $\alpha$	G281-2626	6 $\mu$ g/ml	Na-PP pH 6,5	Becton Dickinson
TNF- $\alpha$ Biotin	MP6-XT3	0,5 $\mu$ g/ml		Becton Dickinson

**Tab. 5. Standards für die ELISA-Bestimmung (rekombinant murine Zytokine):**

rmIL-1 $\beta$	R&D Wiesbaden
rmIL-4	Tebu GmbH, Pharmingen
rmIL-6	Becton Dickinson
rmIL-10	Becton Dickinson (Kit)
rmIL-12	Becton Dickinson (Kit)
rmTNF- $\alpha$	Becton Dickinson

**Tab. 6. Antikörper für die Bestimmung der Immunglobuline**

Capture-Antikörper	Detektor-Antikörper	Substrat
Anti-IgG (2 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG-AP 1:2000	pNPP
Anti-IgG1 (2 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG1-AP 1:1000	pNPP
Anti-IgG2b (2 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG2b-AP 1:500	pNPP
mBSA (1,5 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG-PO 1:2000	OPD
mBSA (1,5 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG1-AP 1:1000	pNPP
mBSA (1,5 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG2a-AP 1:500	pNPP
mBSA (1,5 $\mu$ g/ml)	Anti-IgG2b-AP 1:1000	pNPP

mBSA (1,5 µg/ml)	Anti-IgM-AP 1:1000	pNPP
KollagenI	Anti-IgG-PO 1:2000	OPD
KollagenII	Anti-IgG-PO 1:2000	OPD
Proteoglykane	Anti-IgG-PO 1:2000	OPD

(alle Anti-Ig-Antikörper: Ziege-Anti-Maus, Southern Biotechnology Associates Inc.)

#### 4.1.3.2 Verwendete Kulturmedien und Lösungen

**LB-Medium:** 12,5 g LB-Medium wurden mit H<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert.

**LB-Medium unter Zusatz von Kanamycin:** Das Kanamycin wurde direkt vor Gebrauch im Verhältnis 1:500 zu dem LB-Medium pipettiert.

**Agar-Platten unter Zusatz von Kanamycin:** 12,5 g LB-Medium wurde zusammen mit 5 g Agar mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 42 °C konnte das Antibiotikum im Verhältnis 1:500 zugesetzt und die Platten gegossen werden.

**5-fach TBE-Puffer:** pH 8,0-8,1

54 g TRIS und 27,5 g Borsäure wurden gemeinsam in H<sub>2</sub>O gelöst, während 4,65 g EDTA, Tris und Borsäure separat in destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst wurden. Alles zusammen wurde mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.

#### **Lysepuffer:**

20 mM HEPES pH 7,4

150 mM NaCl

1 % Triton X 100

10 mM Natrium-Pyrophosphat

2 mM EGTA

20 mM Zinkacetat

50 mM Natrium-Fluorid

Direkt vor Gebrauch des Lysepuffers wurden zu 5 ml dieser Stammlösung 10 µl Natrium-Vanadat, 50 µl PMSF und 25 µl Leupeptin hinzupipettiert.

**X-Gal-Färbelösung:** (auf Eis)

10,0 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,3), 6,0 ml 50 mM Kalium-Ferricyanid, 6,0 ml 50 mM Kalium-Ferrocyanid und 0,13 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$  wurden in Lösung gebracht und mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt. Direkt vor dem Benutzen wurde im Verhältnis 1:100 X-Gal-Lösung (100 mg/ml) zur Färbelösung dazugegeben und anschließend steril filtriert.

**Arbeitslösung für die X-Gal-Färbung:**

50,0 ml 4 % Paraformaldehyd, 49,2 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) und 0,8 ml 25 % Glutaraldehyd wurden zusammen in Lösung gebracht.

**Natriumphosphatpuffer:** 0,1 M, pH 7,3

8 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 2 ml 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  wurden mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt.

**PBS:**

Lösung A: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  und 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 800 ml aufgefüllt.

Lösung B: 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  und 0,1 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  wurden mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 200 ml aufgefüllt.

Die Lösungen wurden 30 min bei 121 °C autoklaviert und zum Gebrauch die Lösungen A und B im Verhältnis 4:1 vermischt.

**Puffer für die ELISA-Bestimmung:****Beladungspuffer:**

Na-CO: Natriumkarbonatpuffer 100 mM (pH 9,5)

Na-PP: Natriumphosphatpuffer 200 mM (pH 6,5)

$\text{NaHCO}_3$ : Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 9,5)

**Waschpuffer:**

Tween 20 0,05 % in PBS



**Blockierungspuffer:**

BSA 3 % in PBS

**Assay-Puffer:**

BSA 1 %

Tween 20 0,05 % in PBS

**Griess-Reagenz:**

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 %

Sulfanilamid 1 %

N-(1-Naphtyl)ethyldiamindihydrochlorid 0,1 %

**Türk'sche Lösung:**

2 %ige Essigsäure

Einige Kristalle Gentianaviolett wurden in der Essigsäure gelöst und steril filtriert.

**Substratlösung für Peroxidasereaktion im ELISA:**

2 mg/ml OPD in 100 mM Zitratpuffer; pH 4,8 mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Klonierung der Plasmide**

#### **4.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Von einer mit dem E. coli-Stamm TG1 bewachsenen LB-Agarpetrischale wurden Kolonien in je 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C in Reagenzgläsern geschüttelt. Die TG1-Zellen wurden dann in 400 ml LB-Medium bis zu einer Optischen Dichte (OD)<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. In 20 ml eiskaltem 0,1 molarem CaCl<sub>2</sub> erfolgte die Resuspension des Zellpellet. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis folgte ein wie oben bereits beschriebener Zentrifugationsschritt. Die Zellen wurden in 4 ml eiskaltem 0,1 molarem CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Dann wurden 450 µl steriles Glycerol hinzupipettiert, und die Zellen wurden in dieser Lösung in Portionen zu je 100 µl in Eppendorf-Tubes bei -80 °C

eingefroren. Der Erfolg des Vorgangs wurde durch eine Transformation der TG1-Zellen überprüft, wobei die Kultivierung der verwendeten Zellen im Brutschrank bei 37 °C erfolgte.

#### **4.2.1.2 Transformation von TG1-Zellen**

Die bei -80 °C eingefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis belassen, und der Vektor wurde hinzupipettiert. Nach vorsichtigem Auftauen blieb der Ansatz für 30 min auf Eis. Anschließend folgte eine Inkubation von 90 s bei 42 °C, nach der die Zellen auf Eis abgekühlt wurden. Der Transformationsansatz wurde mit LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum auf 1000 µl aufgefüllt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Handelte es sich um die Transformation eines Ligationsansatzes, so wurden die Zellen bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie auf einer Antibiotikum enthaltenden Agarplatte ausplattiert. Bei der Vervielfältigung von Vektoren wurden 100 µl der Zellsuspension ohne den Zentrifugationsschritt auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### **4.2.1.3 Plasmidisolierung**

Einzelne Kolonien wurden von den Agarplatten gepickt und in 3 ml Antibiotikumhaltigem LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Von diesen Zellklonen aus konnten die Plasmide mittels Mini- bzw. Midipräparation entsprechend der Anleitungen der verwendeten Kits gewonnen werden. Im Anschluss daran wurde der Erfolg dieser Präparationen durch Auftragen geringer Plasmidmengen auf ein Agarosegel, d. h. bei Minipräparation 5 µl, bei Midipräparation 1 µl DNA, ermittelt. Für die genaue Konzentrationsermittlung bzw. -einstellung wurde die OD<sub>260</sub> bestimmt, bei der für Doppelstrang-DNA gilt, dass eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Plasmid-DNA wurde jeweils auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

#### **4.2.1.4 Vorbereitungen für eine Ligation**

Um in ein vorgefertigtes Plasmid an definierter Stelle ein Insert einzubringen, müssen beide vorher mit Restriktionsendonukleasen inkubiert werden. Diese Enzyme schneiden

einen DNA-Doppelstrang in genau vorbestimmter Weise, indem sie eine spezifische Sequenz im Strang erkennen, dort binden und an dieser Stelle bzw. in der Umgebung die DNA-Doppelstränge durchtrennen. Dabei entstehen entweder glatte Schnittländer oder sogenannte „sticky ends“, bei denen ein Strang den anderen überlappt. Für eine Ligation von Plasmid und Insert werden möglichst zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, um eine Religation des Plasmids ohne Aufnahme des Inserts zu vermeiden. Bei dem Insert handelte es sich hier um das IL-4 bzw. das IL-10. Um zu gewährleisten, dass sich vor und hinter den Genen für die Interleukine die entsprechenden Sequenzen für die Restriktionsendonukleasen befinden, wurde mit der für die Interleukine kodierenden DNA eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dazu wurden Primer ausgewählt, die in ihrer Sequenz die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen tragen, so dass bei der PCR Fragmente entstanden, die durch anschließende Inkubation mit den Restriktionsenzymen die erforderlichen Enden aufwiesen. Nähere Angaben zu den hier verwendeten Restriktionsendonukleasen finden sich in der Tab. 2, und die jeweiligen Primer für die hier durchgeführten PCRs sind in der Tab. 3 näher charakterisiert.

Für die Herstellung der Plasmide pIRES2/IL-4/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 wurde das IL-4 in einer PCR unter Verwendung der Primer F6834-33 und F6835-33 vervielfältigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten. Für das Plasmid pIRES2/IL-10/EGFP wurde das IL-10 mit dem Primerpaar F6832-33 und F6833-33 mittels PCR amplifiziert und anschließend mit den Enzymen XhoI und BamHI verdaut. In das bicistronische Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 wurden beide Zytokine kloniert. In die MCS wurde das IL-4 wie oben beschrieben kloniert, und das IL-10 nimmt die Stelle des EGFP ein, das zu diesem Zweck herausgeschnitten wurde. Für diesen zweiten Schritt wurde das IL-10 in der PCR mit den Primern F7368-39 und F7369-33 vervielfältigt und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen BstXI und NotI geschnitten. Eine Übersicht über die einzelnen Klonierungen bietet die Abb. 3.

#### 4.2.1.5 Ligation

Für die Ligationen wurden in unterschiedlichem Verhältnis das Plasmid und das jeweils wie oben beschrieben vorbereitete Insert in einem Ansatz gemischt. Als Gesamtvolumen wurden 20 µl veranschlagt, wobei idealer Weise das Verhältnis von Vektor zu

Insert 1:3 betragen sollte. Unter Zusatz von H<sub>2</sub>O, 10-fachem Puffer und einer T<sub>4</sub>-Ligase erfolgte die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend in TG1-Zellen transformiert. Um die Anzahl der Religationen des Vektors abzuschätzen, wurde ein Kontrollansatz ohne Insert mitgeführt.

#### **4.2.1.6 Überprüfung der Ligation**

Nachdem mittels Mini-Präparation die Plasmide gewonnen worden waren, erfolgte die Kontrolle des Ligationserfolges zunächst durch Restriktionsverdau. Dazu wurde der Vektor mit Enzymen geschnitten, die es ermöglichten, anhand der Größe der entstehenden Fragmente nach Auftrennung dieser im Agarosegel zu erkennen, ob das Insert aufgenommen worden war. In diesen Versuchen wurden die Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen geschnitten, mit denen das Insert jeweils hineingebracht worden war. Eine Ausnahme bildete das bicistronische Plasmid, bei dem aufgrund einer Schnittstelle für das Enzym BamHI innerhalb des IL-10 stattdessen mit Sall verdaut werden musste. Die zwei Plasmide mit jeweils einem der Interleukine als Insert wurden in einem Doppelverdau mit den jeweils verwendeten Restriktionsenzymen inkubiert, und als Kontrolle wurde der Ausgangsvektor pIRES2/EGFP mit nur einem Enzym geschnitten. Anschließend wurden die Ansätze auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur weiteren Überprüfung der klonierten Plasmide wurde eine Sequenzierung durchgeführt, mit deren Hilfe bei entsprechender Wahl der Primer (siehe Tab. 3) die Aufnahme der Inserts in die Plasmide nachgewiesen wurde.

#### **4.2.1.7 Herstellung des bicistronischen Plasmids**

Das dritte in diesen Versuchen verwendete Plasmid kodiert die beiden Zytokine IL-4 und IL-10. Hier wurde als Ausgangsvektor das bereits klonierte Plasmid pIRES2/IL-4/EGFP verwendet. Zunächst wurde das EGFP durch die Restriktionsenzyme BstXI und NotI herausgeschnitten. Bei diesem sogenannten präparativen Verdau wurden 40 µl DNA und 2 µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wurde durch den Auftrag geringer Mengen DNA auf ein Agarosegel überprüft. Anschließend wurde das restliche geschnittene Plasmid auf ein präparatives 0,8 %iges Gel aufgetragen, aus dem nach Auftrennung von Plasmid und EGFP der linearisierte Vektor ausgeschnitten und mit Hilfe eines entsprechenden Kits

aufgereinigt wurde. Wie oben beschrieben wurde das IL-10 mit Hilfe der Primer F7368-39 und F7369-33 in der PCR vervielfältigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit dem linearisierten Vektor ligiert, so dass ein Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 entstand, in dem das IL-10 an die Stelle des EGFP getreten ist.

#### **4.2.1.8 Polymerase-Ketten-Reaktion**

Diese Methode dient der Amplifizierung von DNA, wobei der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt durch die Wahl des 5'- und des 3'-Primers bestimmt ist, die die Replikation je eines der komplementären Stränge initiieren.

Die PCR besteht aus mehreren Arbeitsschritten. Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge, der die Hybridisierung der Primer mit den komplementären Sequenzen, auch Annealing genannt, folgt. Anschließend wird die Synthese des neuen Stranges eingeleitet.

Als eine Sonderform der PCR kann man die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ansehen, der ein Arbeitsschritt vorangestellt wird. Hier dient als Ausgangsmaterial die aus Zellen gewonnene RNA, die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase zunächst in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden muss, bevor eine PCR angeschlossen werden kann.

Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Programm (Tab. 7) eignete sich sowohl für eine humanes- $\beta$ -Aktin-PCR, die zur Überprüfung einer RT-PCR nach RNA-Isolierung erfolgte, als auch für die Amplifizierung der Interleukine. In der Tab. 7 sind weiterhin die Schritte einer Sequenzierungsreaktion dargestellt, die unten näher beschrieben wird.

Der Erfolg der PCR wurde jeweils durch Auftrag geringer Mengen des PCR-Produktes auf ein 2 %iges Agarosegel überprüft.

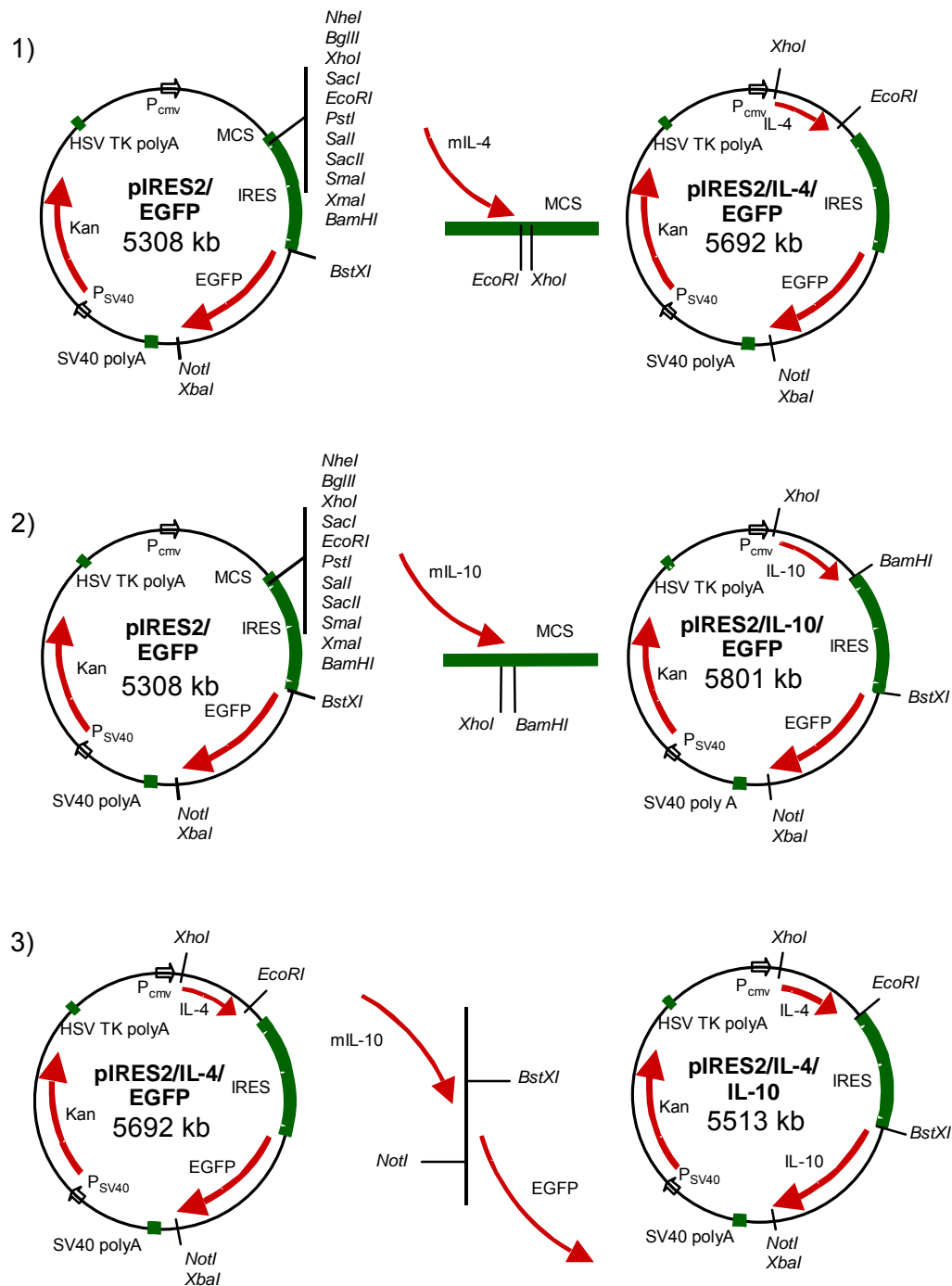


Abb. 3. Klonierungsschemata:

- 1) Klonierung von pIRES2/IL-4/EGFP: Restriktionsverdau des Ausgangsplasmids pIRES2/EGFP mit *XhoI* und *EcoRI* und Ligation mit IL-4
- 2) Klonierung von pIRES2/IL-10/EGFP: Restriktionsverdau des Ausgangsplasmids pIRES2/EGFP mit *XhoI* und *BamHI* und Ligation mit IL-10
- 3) Klonierung von pIRES2/IL-4/IL-10: Restriktionsverdau des Plasmids pIRES2/IL-4/EGFP mit *NotI* und *BstXI* und Ligation mit IL-10

**Tab. 7. PCR-Programme:**

PCR-Programm	Start	Annealing	Elongation	Denaturierung	Zyklen	Ende
Humanes- β-Aktin/ IL-4 und IL-10	94 °C 5 min	65 °C 50 sec	72 °C 50 sec	94 °C 1 min	30	72 °C 5 min, 4 °C ENDE
Sequenzierung	95 °C 2 min	95 °C 1 min	50 °C 45 sec	60 °C 4 min	25	4 °C ENDE

#### 4.2.1.9 Sequenzierung

Um die DNA-Proben zu sequenzieren, wurde die Kettenabbruchmethode von Sanger in einer modifizierten Variante angewendet. Hierbei wurde der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer verwendet, der die Fragmente per Kapillargelelektrophorese auftrennt und ein Laserdetektionssystem zur Identifizierung der verschiedenen fluoreszierenden ddNTP besitzt.

Dem Prinzip liegt eine lineare PCR zugrunde, bei der nur der 3'- bzw. der 5'-Primer verwendet wird. Durch die zusätzlich in diesem Ansatz befindlichen ddNTPs, die bei ihrem Einbau einen vorzeitigen Kettenabbruch induzieren, entstehen unterschiedlich lange Fragmente von bis zu 500 Basen. Die hier verwendeten ddNTPs sind kovalent mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, wobei für jede der vier Basen eine andere Farbe gewählt wurde. Dadurch ist die Detektion dieser Base mit Hilfe des Lasersystems möglich, welches die Wellenlänge des durch die Anregung mit dem Laser emittierten Lichtes bestimmt.

Der Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR enthielt variable Mengen der zu analysierenden DNA, den 3'- oder 5'-Primer, mit dessen Hilfe die in die Plasmide klonierten Interleukine für die Ligation amplifiziert wurden, H<sub>2</sub>O, Puffer, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs sowie das Enzym TAQ-Polymerase. In dieser Arbeit erfolgten die Sequenzierungen direkt von den Plasmiden ausgehend. Das Programm der Sequenzierungsreaktion ist in Tab. 7 beschrieben. An die Sequenzierungsreaktion anschließend erfolgte die Aufreinigung des Sequenzieransatzes, um die überschüssigen Farbterminatoren zu entfernen. Dazu wurde der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt

und mit 10 µl Natriumacetatlösung (3 M, RT) und 250 µl Ethanol (96 %, RT) versetzt. Nach dem Vortexen erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 14000 rpm für 15 min bei RT. Das Pellet wurde mit 250 µl Ethanol (70 %, RT) gewaschen. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und RT wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in der Vakuum-Zentrifuge bei 37 °C für 5 min getrocknet. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 20 µl Template Suppression Reagent. Die Sequenzierung wurde anschließend wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 4.2.2 In-vitro-Transfektion

Für die In-vitro-Transfektion wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet: 293-Zellen, eine humane Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen, und 3T3-Fibroblasten, die aus Schweizer Albinomäusen stammen.

293-Zellen wurden in je 2 ml MEM/E-Medium mit 10 % FKS in 6-Well-Platten pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren sie zu ca. 80 % konfluent. Vor der Transfektion wurden sie zwei Mal mit MEM/E-Medium gewaschen und mit 2 ml frischem MEM/E-Medium mit 10 % FKS versehen. Für die 3T3-Fibroblasten wurden die gleichen Bedingungen zur Transfektion geschaffen. Als Medium wurde hier DMEM-Medium mit 10 % FKS und 1 % Bikarbonat verwendet.

Die In-vitro-Transfektion wurde mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Für eine Transfektion mit dem Effectene Transfection Reagent (Effectene TR) der Firma Qiagen wurden die Plasmide pIRES2/EGFP, pIRES2/IL-4/EGFP, pIRES2/IL-10/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 folgendermaßen vorbereitet: je 6 µl DNA wurden mit 144 µl EC-Puffer und 8 µl Enhancer versetzt, gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Effekten hinzugefügt und nach 10 sec Vortexen für 5-10 min bei RT inkubiert. Pro Well wurden jeweils 88 µl der Plasmidlösung zu den Zellen pipettiert, und diese wurden zwei Tage lang wie oben beschrieben im Brutschrank inkubiert.

Eine weitere Methode zur Transfektion wurde mit Hilfe des Jet PEI<sup>TM</sup>-RGD Cationic Polymer Transfection Reagent (RGD-TR) (Qbiogene) entsprechend der Anleitung durchgeführt. Dieses Reagenz enthält eine Proteinsequenz aus Arginin, Glycin und



Asparaginsäure, die an Integrinrezeptoren binden kann. Um einen Vergleich der Effizienz dieser beiden Methode zu ermöglichen, wurden hier die gleichen Versuchsbedingungen wie Konzentration an Zellen und eingesetzte DNA-Menge gewählt. Es wurden 6 µl DNA, 200 µl 150 mM NaCl und ein vorher gemischter Ansatz aus 12 µl PEI-Reagenz und 200 µl 150 mM NaCl zusammenpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden pro Well jeweils 200 µl der plasmidhaltigen Lösung zu den Zellen pipettiert und diese wie oben beschrieben im Brutschrank belassen.

Die dritte Methode, die hier zur Transfektion angewendet wurde, ist die Elektroporation. Bei diesem Vorgang wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes eine Membranpermeabilisierung erreicht, die die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen ermöglicht. Die Elektroporation fand unter folgenden Bedingungen statt: die zu transfizierenden Plasmide wurden linearisiert. Jeweils 20 µg in H<sub>2</sub>O gelöstes Plasmid wurde zu 0,8 ml einer Zellsuspension von 3T3-Fibroblasten ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml in PBS) pipettiert. Die Küvette wurde für 10 min auf Eis belassen, und anschließend erfolgte die Elektroporation mit dem Gene pulser bei 25 µF, 200 Ω und 1,0 kV. Die Zellsuspension wurde nochmals für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend auf einer 6-Well Platte ausplatiert.

Die Auswertung der Plasmidexpression erfolgte zum einen fluoreszenzmikroskopisch nach 24 h. Zum anderen wurde durch RNA-Isolierung ein Zytokinnachweis nach 48 h durchgeführt und mittels ELISA eine Proteinbestimmung aus dem Zellüberstand und dem Lysat transfizierter Zellen angeschlossen.

#### **4.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Plasmidexpression**

Zwei der zur Transfektion verwendeten Plasmide kodieren für das grün fluoreszierende Protein EGFP. Der Nachweis dieses Proteins erfolgte mit Hilfe der spektralen Analyse. Zur Exzitation wurde Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm verwendet. Das so angeregte Protein emittierte Lichtstrahlen mit einer Wellenlänge von 509 nm.

#### **4.2.2.2 Nachweis der Zytokinexpression durch RNA-Isolierung**

Zur RNA-Gewinnung wurden die adhärenenten Zellen von der Oberfläche abgelöst und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit jeweils 350 µl RLT-

Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit einem RNA-Kit der Firma Qiagen entsprechend den Anweisungen der Anleitung. Anschließend wurde die Konzentration der gewonnenen RNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei gilt, dass eine  $OD_{260}$  von 1 einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  entspricht. Vor der weiteren Verarbeitung der RNA wurde eine Inkubation mit DnaseI für 15 min bei RT durchgeführt, um die restliche DNA zu verdauen. Die DnaseI wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA und Erhitzen des Ansatzes für 10 min auf 65 °C inaktiviert. Es folgte eine nochmalige Bestimmung der RNA-Konzentration bei der  $OD_{260}$ . Für die Umschreibung in eine cDNA wurden 5  $\mu\text{g}$  RNA benötigt. Diese wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 1  $\mu\text{l}$  Oligo-DT wurde hinzupipettiert und der Ansatz für 10 min bei 70 °C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis für ca. 3 min wurde folgender Ansatz zu jeder Probe hinzugefügt:

2  $\mu\text{l}$  10mM dNTPs  
4  $\mu\text{l}$  5x Puffer  
2,5  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$   
0,5  $\mu\text{l}$  Enzym Reverse Transkriptase.

Nachdem der Ansatz für 10 min bei RT belassen wurde, folgte eine Inkubation bei 42 °C für 50 min mit anschließender Erhitzung auf 90 °C für 5 min zur Inaktivierung des Enzyms. Um den Erfolg der Umschreibung in eine cDNA zu überprüfen, wurde eine  $\beta$ -Aktin-PCR durchgeführt.

Dabei wurde in dem oben beschriebenen PCR-Programm folgender Reaktionsansatz verwendet:

27,75  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$   
5  $\mu\text{l}$  10x Puffer  
5  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$   
8  $\mu\text{l}$  1,25 mM dNTPs  
1  $\mu\text{l}$  hu- $\beta$ -Aktin Primer 3'  
1  $\mu\text{l}$  hu- $\beta$ -Aktin Primer 5'  
0,25  $\mu\text{l}$  TAQ  
2  $\mu\text{l}$  cDNA.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt. Bei erfolgreicher Reaktion entstanden Fragmente von einer Größe von 800 Basen.

Nach dieser Kontroll-PCR erfolgte der Zytokin-Nachweis aus der gewonnenen cDNA. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

78,5 µl H<sub>2</sub>O  
10 µl 10x Puffer  
6 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl Primer 3'  
1 µl Primer 5'  
0,5 µl TAQ  
2 µl DNA

Die hier verwendeten Primer entsprachen für das IL-4 und IL-10 denen, mit denen die beiden Zytokine in der PCR zur Vorbereitung für die Ligationen amplifiziert worden waren. Die Überprüfung der PCR erfolgte durch Auftrag des PCR-Produktes auf ein 2 %iges Agarosegel. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe in der PCR, die Positivkontrolle wurde mit den zur Transfektion verwendeten Plasmiden durchgeführt.

#### **4.2.2.3 Nachweis der Zytokinexpression durch Proteinbestimmung**

3T3-Fibroblasten wurden wie oben beschrieben kultiviert und mit den Plasmiden pIRES2/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 transfiziert. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert und bis zur Untersuchung bei -80 °C belassen. Nach einem Waschvorgang des Zellrasens mit PBS erfolgte die Proteinextraktion aus den Zellen. Jedes Well wurde mit 500 µl Lysepuffer inkubiert, und anschließend wurden die lysierten Zellen für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mittels ELISA auf die Zytokine IL-4 und IL-10 hin untersucht; die Methode wird unter 4.2.3.6 beschrieben.

### 4.2.3 In-vivo-Versuche

#### 4.2.3.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Folgende Mäusestämme wurden für die Versuche ausgewählt: für die Vorversuche wurden SCID-Mäuse verwendet. Die Versuche am Modell der AIA wurden an 8-12 Wochen alten weiblichen C57Bl/6-Mäusen durchgeführt (Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena). Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen (12 h Hell-Dunkel-Rhythmus, Altromin-Pellets 1326 und Wasser ad libidum) im Tierhaus des Institutes für Pathologie.

#### 4.2.3.2 Vorversuche

In einem Vorversuch wurden unterschiedliche Konzentrationen des Ausgangsplasmids pIRES2/EGFP SCID-Mäusen intraartikulär appliziert. Das Plasmid wurde in Mengen von 5, 10 und 15 µg in jeweils 30 µl PBS gelöst, von denen jeder Maus 25 µl in das rechte Kniegelenk injiziert wurden. In einem zweiten Versuch wurde 25 µg Plasmid-DNA der Plasmide pCMV-β und pIRES2/EGFP – in 25 µl PBS gelöst – i. a. injiziert.

Die Auswertung erfolgte am Tag 2 bzw. im zweiten Versuch an den Tag 5 und 7 nach i. a.-Injektion. Die Tiere wurden in Äthernarkose durch einen Carotisschnitt ausgeblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Beide Kniegelenke wurden entnommen und zum Erstellen von Gefrierschnitten in 8 %ige Gelatine gebettet. Die Schnitte wurden mit einer Schichtdicke von 8 µm erstellt und, um das gesamte Knie zu erfassen, in mehreren Tiefen vorgenommen. Es wurden drei Tiefen erfasst und jeweils drei Schnitte mittels Tape-Band auf Objektträgern fixiert. Zusätzlich wurde ein Schnitt für eine Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbung abgenommen.

Die Detektion des Reportergens EGFP erfolgte – wie bei den In-vitro-Versuchen beschrieben – unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm.

Die Färbung der Kniegelenkschnitte aus dem zweiten Versuch wurde wie folgt durchgeführt: die auf den Objektträgern fixierten Schnitte wurden mit PBS-Lösung gewaschen, anschließend bei 4 °C für 10 min mit der Arbeitslösung fixiert, wiederum zwei Mal mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend bei 37 °C mit der Färbelösung X-Gal inku-

biert. Die Auswertung dieser Gelenkschnitte erfolgte im Lichtmikroskop. Ein positives Ergebnis zeigte sich hier durch Blaufärbung der  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Zellen.

#### 4.2.3.3 Antigen-induzierte Arthritis

Am Tag -21 und nochmals am Tag -14 wurde den Mäusen eine s. c.-Injektion von je 100  $\mu$ l Antigen-Adjuvanz in die Flanke bzw. in die Schwanzwurzel appliziert. Zusätzlich erfolgte zu den genannten Zeitpunkten eine intraperitoneale Gabe von  $10^9$  hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis*-Keimen. Am Tag 0 wurde den Tieren unter Äthernarkose das Antigen mBSA (100  $\mu$ g mBSA in 25  $\mu$ l physiologische NaCl-Lösung, steril filtriert) in das jeweils rechte Kniegelenk injiziert. Das linke Knie der Tiere blieb unbehandelt und diente als Kontrollknie in Bezug auf Gelenkschwellung und Histologie.

Für die Herstellung des Antigen-Adjuvanz wurden 2 mg/ml mBSA, gelöst in physiologischer NaCl-Lösung und steril filtriert, mit komplettem Freund'schen Adjuvanz, das mit 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA supplementiert wurde, zu gleichen Teilen gemischt. Jedem Tier wurde damit pro Immunisierung 0,1 mg mBSA und 0,1 mg *Mycobacterium tuberculosis* verabreicht.

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die beiden Gruppen, denen die Plasmide pIRES2/IL-4/IL-10 bzw. pIRES2/EGFP injiziert wurden, bestanden aus je 7 Tieren, die dritte Gruppe enthielt 6 Tiere. Die Plasmide pIRES2/EGFP bzw. pIRES2/IL-4/IL-10 wurden am Tag -1 in einer Konzentration von jeweils 1  $\mu$ g/ $\mu$ l in 25  $\mu$ l physiologischer NaCl-Lösung wie oben beschrieben i. a. appliziert. Der dritten Gruppe wurden 25  $\mu$ l physiologische NaCl-Lösung injiziert. In zweitägigem Abstand wurde beginnend am Tag 1 die Kniegelenksdicke beider Gelenke sowie das Gewicht der Tiere gemessen. Der Versuch endete am Tag 21, an dem die Tiere wie oben bereits beschrieben getötet wurden. Das Serum sowie die beiden Kniegelenke aller Tiere wurden isoliert. Zusätzlich erfolgte bei 5 Tieren jeder Gruppe zur Gewinnung von Makrophagen eine Peritoneallavage mit je 8 ml eiskalter Heparinlösung, für die 10  $\mu$ l Na-Heparinat in 50 ml PBS gelöst wurden.

Der Versuch wurde mit einer geringeren Anzahl an Tieren unter den gleichen Bedingungen wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

#### 4.2.3.4 DTH-Reaktion

Am Tag 7 wurde eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion, eine sog. DTH-Reaktion, ausgelöst. Hierzu wurde das Antigen mBSA in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in physiologischer NaCl-Lösung gelöst und steril filtriert. Anschließend erfolgte eine intradermale Applikation von 12,5 µl der mBSA-haltigen Lösung in ein Ohr. Die Messung der Ohrdicke erfolgte vor der Injektion sowie nach 24 h und 48 h.

#### 4.2.3.5 Makrophagenfunktionstest

Die Heparinlösung der Peritoneallavage wurde bei 4 °C und 1000-1200 rpm für 7 min zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 4 ml PBS aufgenommen. Es erfolgte eine Zellzählung der Makrophagen in einer 1:10-Verdünnung mit Türk'scher Lösung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Zellen wurden anschließend wiederum wie oben beschrieben zentrifugiert und in RPMI-Medium mit 10 % FKS aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml zu je 1 ml in 6-Well-Platten ausgesät wurden. Nach zwei Stunden adhären die Makrophagen. Dann wurden die Zellen mit frischem Medium versehen und mit je 20 bzw. 100 U/ml IFN- $\gamma$ , mit 1000 ng/ml LPS oder gleichzeitig mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 1000 ng/ml LPS stimuliert. Eine Kontrolle blieb jeweils unstimuliert. Nach 42 h wurden die im Überstand befindlichen Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Dazu wurden 96-Well Mikrotiterplatten mit je 50 µl eines Capture-Antikörpers (Tab. 4) in Beladungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend folgte ein dreimaliges Waschen der Platten mit Hilfe des Waschgerätes Columbus (SLT) und das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen durch eine Inkubation mit Blockierungspuffer für 2 h. Nach einem erneuten dreimaligen Waschvorgang folgte das Auftragen einer Standardreihe (Tab. 5) und der Proben. Als Leerwert wurde RPMI-Medium mit 10 % FKS verwendet. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden je 100 µl biotinylierter Detektionsantikörper (Tab. 4) in Assay-Puffer aufgetragen und für 1,5 h bei RT inkubiert. Der letzte Waschvorgang wurde wiederholt. Auf die Platten wurden dann

pro Well 100 µl Streptavidin-PO (1:4000) pipettiert, und nach 40 minütiger Inkubation wurde der fünfmalige Waschvorgang wiederholt. Die Substratlösung (OPD) wurde zu je 100 µl/Well aufgetragen. Der Farbumsatz erfolgte im Dunkeln. Die Reaktion wurde mit 100 µl/Well 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, nachdem die Standardfarbreihe entwickelt war. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei OD<sub>492</sub> gegen eine Referenz von OD<sub>620</sub> gemessen. Die Konzentrationen wurden anhand der Standardkurven ermittelt.

In einer Wiederholung dieses Versuches wurde zusätzlich die NO-Produktion durch Makrophagen bestimmt. Das von den Zellen gebildete NO reagierte im wässrigen Medium zu HNO<sub>2</sub>, welches anschließend zu H<sup>+</sup> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup> zerfiel. Das so entstandene Nitrit wurde mit Hilfe des Griess-Reagenz bestimmt. Es wurden zu 100 µl jeder Probe in einer 96 Well Mikrotiterplatte 100 µl Griess-Reagenz hinzugegeben und im Dunkeln für 10 min bei RT inkubiert. Die Messung wurde bei einer OD<sub>570</sub> gegen einen Referenzwert von OD<sub>620</sub> durchgeführt. Die Berechnung der NO-Konzentration erfolgte durch Quantifizierung mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Standards (1 mM NaNO) in 12 Stufen.

#### **4.2.3.6 Bestimmung der Immunglobulin-Konzentrationen im Serum**

Das Blut der Tiere wurde entnommen. In einem Glasbehälter wurde anschließend das geronnene Blut mit Hilfe eines Glasspatels stumpf von der Oberfläche abgelöst und die flüssige Phase abpipettiert. Diese wurde bei RT für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand nochmals abpipettiert.

Aus dem Serum sollten zunächst das Gesamt-IgG, -IgM, -IgG1 und -IgG2b mittels ELISA bestimmt werden. In einem ersten Schritt wurden 96-Well-Platten mit einer speziellen hydrophoben Oberfläche mit Capture-Antikörpern (Tab. 6) beschichtet, indem sie über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Der Überschuss wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. In einem nächsten Schritt erfolgte ein 2-stündiges Blocken der noch freien Bindungsstellen auf der hydrophoben Oberfläche durch Zugabe von BSA (2 %ig in PBS). Der Waschschrift wurde wiederholt. Als nächstes wurde das Serum in einer Verdünnungsreihe zu je 50 µl pro Well hinzupipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Wells wurden nochmals mit PBS gewaschen, um die nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Nun erfolgte bei RT für 1 h die Zugabe von Detektor-Antikörpern, die mit AP bzw. PO (Tab. 6) markiert waren und an die Serum-

Immunglobuline binden konnten. Nach Entfernen der überschüssigen Detektor-Antikörper wurde das Substrat PNPP der AP bzw. die Substratlösung OPD für die PO hinzupipettiert. Bei einer OD<sub>405</sub> (gegen OD<sub>690</sub>) wurde für das AP bzw. bei einer OD<sub>492</sub> (gegen OD<sub>620</sub>) für das PO der Substratumsatz als Korrelat für das gebundene Serum-Ig gemessen.

Zusätzlich zu der Bestimmung der Gesamt-IgG aus dem Serum erfolgte die Messung von für die Arthritis spezifischen Antikörpern im Serum. Das Prinzip entspricht dem oben geschilderten für das Gesamt-Ig. Es wurden 96-Well-Platten mit dem Antigen mBSA bzw. mit Kollagen Typ I und Typ II (KI und KII) und Proteoglykan (PG) als weitere Antigene beschichtet. Die freien Stellen wurden mit BSA wie oben abgeblockt, und das Serum wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht und ein anschließender Waschvorgang. Mit Hilfe spezifischer Detektor-Antikörper (Tab. 6), die nur an IgG bzw. IgG1, IgG2a oder IgG2b binden konnten, wurde deren Anteil im Serum gemessen.

#### **4.2.3.7 Histologische Auswertung der Entzündung im Kniegelenk**

Die Kniegelenke wurden wie oben beschrieben isoliert, gefroren und in 8 %iger Gelatine gebettet. Es wurden wiederum Gelenkschnitte mit einer Schichtdicke von 8 µm angefertigt, die anschließend HE gefärbt wurden.

Die histologische Auswertung der entzündlichen Veränderungen im Kniegelenk erfolgte anhand von vier Kriterien, für die entsprechend der Schwere ihrer Ausprägung Punkte auf einer Skala von 1 bis 4 gegeben wurden. Der Wert 0 steht für ein normales Kniegelenk, 1 bezeichnet eine milde und 2 eine moderate Entzündung, während 3 für starke und 4 für sehr starke Veränderungen im Kniegelenk stehen.

Das Mesothel der Synovia wurde in Hinsicht auf Abnormitäten im Aufbau wie Transformationen von Synoviozyten und Umwandlung zu Mehrreihigkeit hin begutachtet. Das Ausmaß des zellulären Infiltrates wurde anhand der Menge und Ausdehnung entzündlicher Herde und anhand der exsudativen Reaktion bestimmt. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Intaktheit des Gelenkknorpels. Das Vorhandensein von Knorpelzellnekrosen sowie deren Tiefenausdehnung wurden beurteilt. Darüber hinaus wurde die



Bildung des Pannus und seine Infiltration von Knorpel- und Knochengewebe wie oben beschrieben semiquantitativ bewertet.

#### **4.2.3.8 Transfektion von Makrophagen**

Aus gesunden C57Bl/6-Mäusen wurden wie oben bereits beschrieben mittels Peritoneallavage Makrophagen gewonnen, gezählt und in RPMI-Medium mit 10 % FKS in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml zu je 200  $\mu$ l in Chamber Slides ausgesät. Es wurde eine Transfektion mit pIRES2/EGFP sowie mit pIRES2/IL-4/IL-10 durchgeführt. Die beiden Plasmide wurden mit dem Effectene TR vorbereitet. Jeweils 10  $\mu$ l DNA wurden mit 140  $\mu$ l Puffer und 10  $\mu$ l Enhancer vermischt, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20  $\mu$ l Effectene hinzugegeben, der Ansatz erneut gevortext und 5-10 min bei RT inkubiert. Dann wurde 1 ml Medium hinzupipettiert, und je 145  $\mu$ l des Ansatzes wurden in die Chamber Slides gegeben. Bei der Hälfte der Transfektionen wurde jeweils ein Mediumwechsel nach 4 h durchgeführt. Die Makrophagen wurden für 24 h bei 37 °C im Brutschrank belassen. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Transfektion. Wie oben bereits beschrieben, wurde bei der Transfektion mit pIRES2/EGFP das EGFP nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten die mit pIRES2/IL-4/IL-10 transfizierten Makrophagen.

Zusätzlich zu der Aussaat in Chamber Slides wurden die Makrophagen in derselben Konzentration zu je 2 ml in 6-Well-Platten pipettiert. Es wurde wieder eine Transfektion mit pIRES2/EGFP – diesmal als Kontrollvektor – und mit pIRES2/IL-4/IL-10 mit dem gleichen Reaktionsansatz wie im ersten Versuchsteil durchgeführt. Der Transfektionsansatz wurde zu je 215  $\mu$ l auf die Wells pipettiert. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 4 h. Die Makrophagen wurden bei 37 °C für 24 h im Brutschrank belassen. Anschließend wurde ein Makrophagenfunktionstest wie unter 4.2.3.5 bereits beschrieben durchgeführt.

#### **4.2.3.9. Statistische Auswertung**

Eine statistische Auswertung wurde für die Werte der Gelenkschwellung, der Gewichtsmessung und der DTH-Reaktion für alle drei Gruppen durchgeführt, sowie für den Arthritis-Score insgesamt und für die hierzu herangezogenen vier histologischen Para-

meter der Gruppen (siehe 4.2.3.7). Es wurde mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows, Version 11.5.1, ein nicht parametrischer Test für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt (U-Test nach Mann-Whitney).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Herstellung der Plasmidkonstrukte

Der Klonierungserfolg der drei Plasmidkonstrukte pIRES2/IL-4/EGFP, pIRES2/IL-10/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau der Plasmide überprüft, in dem die Inserts jeweils an den Stellen herausgeschnitten wurden, an denen sie zuvor eingefügt worden waren. Für pIRES2/IL-4/EGFP erfolgte die Inkubation mit den Restriktionsendonucleasen XhoI und EcoRI, pIRES2/IL-10/EGFP wurde mit XhoI und BamHI verdaut, und die Inkubation von pIRES2/IL-4/IL-10 mit den Restriktionsenzymen XhoI und Sall, die das IL-4 wieder herausschneiden, sowie der Verdau mit BstXI und NotI, deren Schnittstellen das IL-10 umfassen, erfolgten nacheinander. Die Auftrennung von Plasmid und Insert wurde mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Abb. 4).

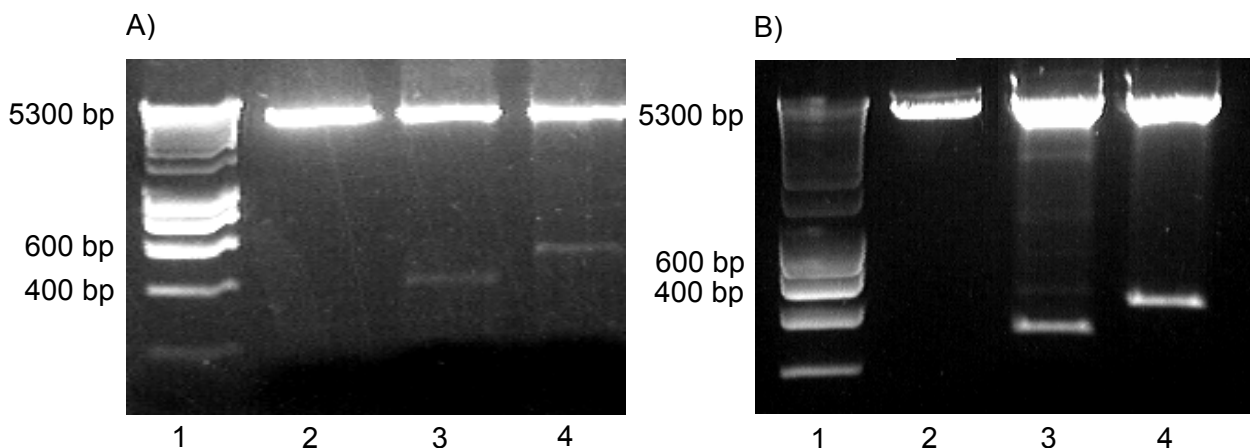


Abb. 4. Agarosegelelektrophorese auf 1,5 %igem Gel nach Restriktionsverdau des Ausgangs-plasmids sowie der klonierten Plasmide. Aufgetragen sind:

A):

- 1: 1000 kb-Marker
- 2: Ausgangsplasmid pIRES2/EGFP linearisiert durch Verdau mit EcoRI
- 3: Doppelverdau von pIRES2/IL-4/EGFP mit XhoI und EcoRI
- 4: Doppelverdau von pIRES2/IL-10/EGFP mit XhoI und BamHI

B):

- 1: 1000 kb-Marker
- 2: Ausgangsplasmid pIRES2/EGFP linearisiert durch Verdau mit EcoRI
- 3: Doppelverdau von pIRES2/IL-4/IL-10 mit XhoI und Sall
- 4: Doppelverdau von pIRES2/IL-4/IL-10 mit BstXI und NotI

Es wurde ein Marker mitgeführt, der die Größenabschätzung der Fragmente ermöglicht. Das Ausgangsplasmid hat eine Größe von 5308 bp, während das IL-4 384 bp und das IL-10 etwa 493 bp lang sind. Als Kontrolle diente das durch den Verdau mit EcoRI linearisierte Ausgangsplasmid.

Zur Bestätigung des Klonierungserfolges wurden abschließend alle drei Vektoren sequenziert. Für die Sequenzierungs-PCR wurden die 5'-Primer gewählt, die bei der Vervielfältigung der Interleukine für die Klonierung verwendet worden waren. Durch die Sequenzierungsreaktionen konnte für alle drei Plasmide die erfolgreiche Klonierung nachgewiesen werden.

## **5.2 In-vitro-Transfektion**

Mittels In-vitro-Versuchen wurden die Plasmide hinsichtlich ihrer Transkribierbarkeit und der Möglichkeit zur Translation überprüft. Hierzu wurden 3T3-Fibroblasten mit dem Plasmid pIRES2/EGFP sowie mit den Plasmiden pIRES2/IL-4/EGFP und pIRES2/IL-10/EGFP mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Anschließend erfolgte der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Plasmidaufnahme durch die Fibroblasten. Bei dieser Transfektionsmethode war einen Tag nach der transienten Transfektion die Expression des EGFP in der Fluoreszenzmikroskopie bei Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm nachweisbar (Abb. 5). Hierbei zeigte sich jedoch eine relativ geringe Transfektionsrate der Zellen.

Aus diesem Grund wurde auf zwei weitere Methoden zur In-vitro-Transfektion von Zellen zurückgegriffen, bei denen zwei andere Transfektionsmethoden, das Effectene TR und das RGD-TR, zur Vorbereitung der Plasmide verwendet wurden. Ziel dieses Methodenvergleiches war es, eine effektive Transfektionsmethode für 3T3-Fibroblasten zu finden.

Für die beiden Transfektionsansätze galten die gleichen Voraussetzungen. Die Transfektion fand mit zu ca. 80 % konfluierenden Zellen statt, die am Vortag in 6-Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C belassen worden waren. Zur Transfektion wurden pro Well 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Überprüfung erfolgte jeweils am ersten Tag nach der Transfektion durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Expression

des EGFP. Hierbei zeigte sich ein Transfektionserfolg bei beiden Methoden. Die Transfektionsrate lag aber sowohl bei der Transfektion mit pIRES2/IL-4/EGFP als auch bei der mit pIRES2/IL-10/EGFP unter Verwendung des Effectene TR deutlich höher als bei Transfektion mit Hilfe des RGD-TR (Abb. 6).

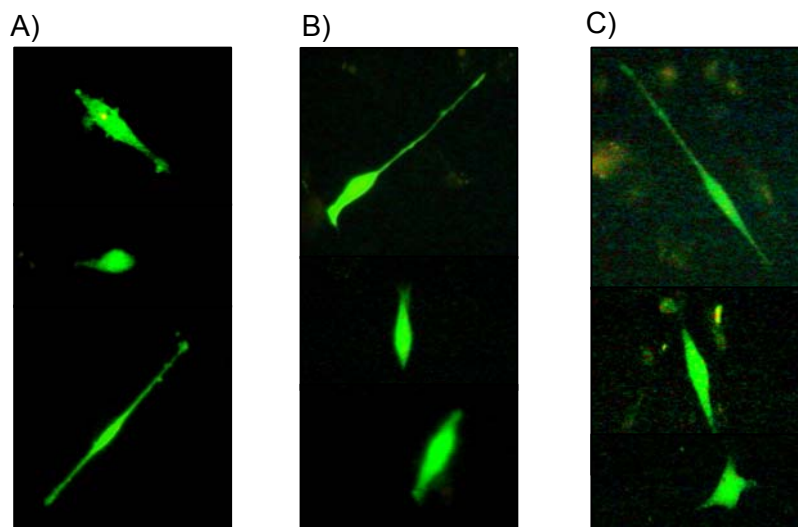


Abb. 5. Fluoreszenzmikroskopische Bilder nach In-vitro-Transfektion von 3T3-Fibroblasten mittels Elektroporation. Die Transfektion erfolgte mit den Plasmidkonstrukten:  
 A) pIRES2/EGFP,  
 B) pIRES2/IL-10/EGFP,  
 C) pIRES2/IL-4/EGFP,  
 Vergrößerung 400fach.

Eine Wiederholung der Transfektionsversuche mit den beiden obengenannten Methoden zeigte trotz konstanter Versuchsbedingungen eine starke Schwankung der Transfektionsrate. Weiterhin wurde zum Vergleich der Transfektionsrate eine andere Zelllinie, die 293-Zellen, verwendet. Als Transfektions-Reagenz wurde hier das Effectene TR unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben eingesetzt. Ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis erfolgte einen Tag nach der Transfektion. Dabei zeigte sich auch bei Wiederholung dieses Versuches eine wesentlich höhere Transfektionsrate, als bei Verwendung der 3T3-Fibroblasten erzielt werden konnte.

Neben dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Transfektionserfolges wurde die Transkription der Plasmide pIRES2/IL-4/EGFP und pIRES2/IL-10/EGFP durch RNA-Gewinnung und anschließenden Zytokinnachweis mit Hilfe der PCR überprüft.

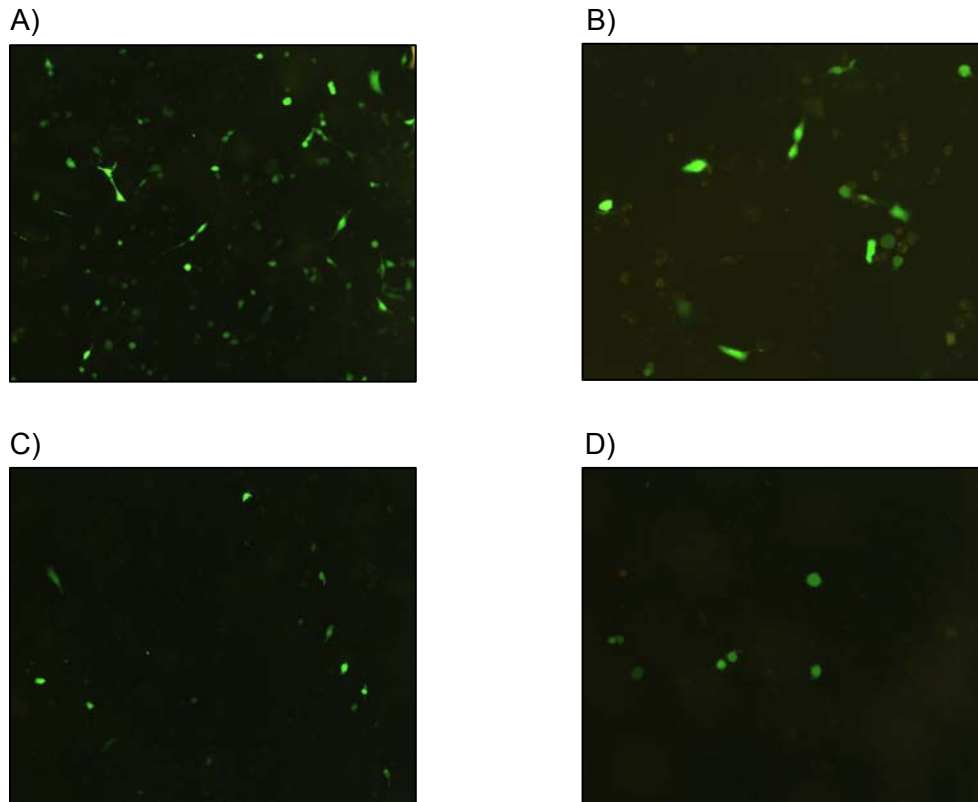


Abb. 6. Fluoreszenzmikroskopische Bilder nach In-vitro-Transfektion von 3T3-Fibroblasten mittels Effectene TR bzw. RGD-TR;  
Transfektion mit pIRES2/IL-4/EGFP: A) mittels Effectene TR, C) mittels RGD-TR;  
Transfektion mit pIRES2/IL-10/EGFP: B) mittels Effectene TR, D) mittels RGD-TR  
Vergrößerung A und B 100fach, C und D 200fach.

Dieser Versuch wurde aufgrund der höheren Transfektionsrate mit den 293-Zellen durchgeführt. Diese wurden zu 80 % konfluent in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C belassen. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit Hilfe des Effectene TR mit jeweils 3 µg DNA der drei Plasmide pIRES2/IL-4/EGFP, pIRES2/IL-10/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10. Am folgenden Tag wurde für die EGFP kodierenden Plasmide fluoreszenzmikroskopisch die Transfektion nachgewiesen. Die RNA-Gewinnung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Kits und einem anschließenden DNase-Verdau am Tag 2 nach der Transfektion. Durch Umschreibung der RNA in eine

cDNA mittels RT-PCR und anschließenden Zytokinnachweis mit Hilfe der PCR konnte gezeigt werden, dass bei allen drei Plasmiden die Transkription der Interleukin-Sequenzen in eine mRNA erfolgt war. Die Abb. 7 zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte in der Agarosegelelektrophorese. Zur Kontrolle wurden die mittels PCR amplifizierten Zytokine IL-4 und IL-10 mitgeführt.

Darüber hinaus wurde in einem Versuch mit 3T3-Fibroblasten überprüft, ob ein direkter Zytokinnachweis des IL-4 und IL-10 aus den Zelllysaten sowie aus dem Zellüberstand möglich ist. Zu diesem Zweck erfolgte wie oben beschrieben eine Transfektion von 3T3-Fibroblasten mit Hilfe des Effectene TR mit den Plasmiden pIRES2/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10. Für den Kontrollvektor pIRES2/EGFP konnte nach 24 h durch den Nachweis des Reportergens der Transfektionserfolg gezeigt werden. Anschließend wurde der Überstand der Zellen abgenommen und eine Proteinextraktion aus den 3T3-Fibroblasten durchgeführt. Aus dem Zellüberstand sowie den Proteinextrakten wurde mittels ELISA die Konzentration von IL-4 und IL-10 bestimmt. Die Konzentrationen lagen allerdings in beiden Fällen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Systems.

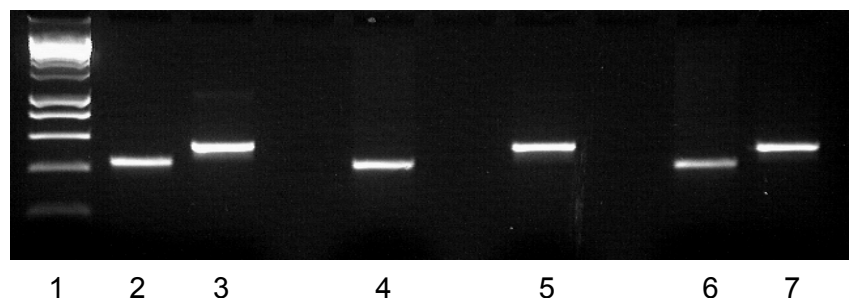


Abb. 7. Nachweis der Transkription der Plasmide nach In-vitro-Transfektion. Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte auf 2 %igem Gel nach RNA-Gewinnung und Umschreibung in cDNA.

- 1: 1000 kb-Marker
- 2: IL-4-Kontroll-PCR
- 3: IL-10-Kontroll-PCR
- 4: IL-4-Nachweis aus pIRES2/IL-4/EGFP
- 5: IL-10-Nachweis aus pIRES2/IL-10/EGFP
- 6: IL-4-Nachweis aus pIRES2/IL-4/IL-10
- 7: IL-10-Nachweis aus pIRES2/IL-4/IL-10

### **5.3 Reporterexpression nach In-vivo-Transfektion**

Im Anschluss an die In-vitro-Versuche wurden zunächst Vorversuche an Mäusen unternommen, in denen eine Transfektion von Zellen nach i. a.-Injektion von Plasmiden untersucht wurde.

Ein erster Versuch wurde mit dem Ausgangsplasmid pIRES2/EGFP durchgeführt. Dieses wurde in Konzentrationen von 0,17 µg/µl, 0,33 µg/µl und 0,5 µg/µl gelöst in je 25 µl PBS jeweils einer SCID-Maus in das rechte Kniegelenk injiziert. Am Tag 2 nach der Injektion wurden beide Kniegelenke der drei Tiere entnommen und Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden wie in den In-vitro-Versuchen fluoreszenzmikroskopisch bei einer Wellenlänge von 488 nm auf das Reportergen EGFP untersucht. Aufgrund einer sehr starken Eigenfluoreszenz von Knorpel- und Knochenmatrix war eine Aussage über die Expression des EGFP anhand dieser Schnitte nicht möglich (Abb. 8).

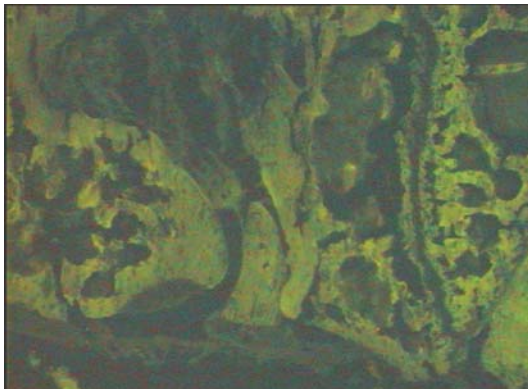


Abb. 8. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Schnitts durch das rechte Kniegelenk einer Maus 2 Tage nach i. a.-Injektion von 12,5 µg des Plasmids pIRES2/EGFP; 50fache Vergrößerung.

Aus diesem Grund wurde ein zweiter Versuch mit dem Plasmid pCMV-β durchgeführt, das für das Enzym β-Galaktosidase kodiert. Zur Kontrolle wurden hier das Plasmid pIRES2/EGFP mitgeführt. Die drei Plasmide wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl in je 25 µl PBS gelöst und jeweils 2 SCID-Mäusen in das rechte Kniegelenk injiziert. Die Auswertung erfolgte am Tag 5 bzw. am Tag 7 nach der Injektion. Nach Präparation der Kniegelenke wurden Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden zunächst fluoreszenzmikroskopisch begutachtet. Hierbei zeigte sich wie im ersten Versuch eine starke Ei-



genfluoreszenz der Gewebe, die bei allen drei verwendeten Plasmiden eine ähnlich starke Intensität aufwies. Weiterhin wurden die Gelenkschnitte mit einer Spezialfärbemethode zum Nachweis des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase behandelt. Die Abb. 9 zeigt mikroskopische Bilder der Gelenkschnitte, die nach der Färbung aufgenommen wurden. Die Kontrollgelenkschnitte von den Tieren, denen pIRES2/EGFP injiziert worden war, wiesen keinerlei Färbung auf. Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase gelang aber in den Gelenkschnitten der Tiere, denen das Plasmid pCMV- $\beta$  appliziert worden war. Hier zeigte sich eine Blaufärbung insbesondere im Bereich der Wachstumsfugen, unter dem Periost sowie im Bereich des Femurmarkraumes. Eine Plasmidaufnahme durch Zellen in der Umgebung des Gelenkes, in das die Plasmidinjektion erfolgt war, war durch die Detektion des Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase bis zu 7 Tage nach i. a. Applikation nachweisbar. Ein Hinweis auf eine Plasmidaufnahme durch Zellen, die direkt mit dem Gelenkspalt kommunizieren, fand sich hier aber nicht.

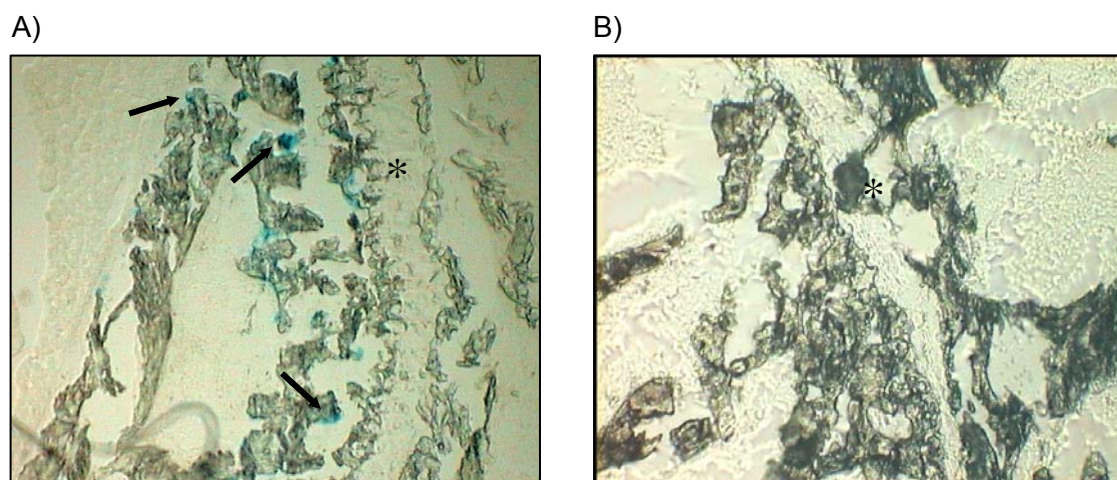


Abb. 9. Gelenkschnitte 5 Tage nach i. a.-Injektion von 25  $\mu$ g Plasmid-DNA: Färbung zum Nachweis des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase; der Stern markiert jeweils die Wachstumsfuge der Tibia.

A): Injektion des Plasmids pCMV- $\beta$ ; Blaufärbung unterhalb der Wachstumsfuge der Tibia sowie im Bereich des Periost (Pfeile); 200fache Vergrößerung

B): Injektion von pIRES2/EGFP als Kontrollplasmid; 400fache Vergrößerung.

## **5.4 In-vivo-Versuche am Modell der AIA**

Auf der Grundlage der Vorversuche wurde am Tiermodell der AIA die Wirksamkeit des Plasmids pIRES2/IL-4/IL-10 überprüft. Die Injektion dieses Plasmids und der beiden Kontrollen pIRES2/EGFP und isotone NaCl-Lösung erfolgte jeweils am Tag -1 vor der Auslösung der AIA. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, denen jeweils 25 µl plasmidhaltige Lösung in einer Konzentration von 1 µg/µl in das rechte Kniegelenk injiziert wurden. Als Parameter für das Ausmaß der Entzündungsreaktion wurde das Gewicht der Tiere und die Schwellung der Kniegelenke regelmäßig bis zum Tag 21 bestimmt. Zusätzlich wurde eine DTH-Reaktion am Tag 7 durchgeführt und anschließend über weitere 48 h die Ohrdicke gemessen. Der Versuch endete am Tag 21, an dem Serum zur Bestimmung der Immunglobuline gewonnen wurde, peritoneale Makrophagen zur Bestimmung ihres Aktivitätszustandes entnommen wurden und die Kniegelenke für eine histologische Begutachtung isoliert wurden.

### **5.4.1 Messung der Kniegelenkschwellung**

Die Messung der Kniegelenkschwellung erfolgte am Tag -1 vor der Injektion der Plasmide sowie ab dem Tag 0 der Auslösung der AIA regelmäßig alle 2 Tage bis zum Tag 21, an dem der Versuch endete. In Abb. 10 ist die Schwellung (gemessen in mm x 0,01) für jeden Tag in Relation zu dem Wert am Tag 0 dargestellt.

Bei allen drei Gruppen waren die Werte am Tag 0 gegenüber denen, die am Tag -1 vor der ersten Injektion in das Kniegelenk gemessen wurden, durch die i. a.-Injektion leicht erhöht. Nach dem Tag 0 der Arthritisinduktion war in allen drei Gruppen eine massive Gelenkschwellung zu erkennen, die etwa am Tag 3 ihr Maximum hatte. Hier zeigte sich für die Gruppe, der das Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 appliziert worden war, eine größere Schwellung als bei den Kontrollen, von denen die mit pIRES2/EGFP behandelte Gruppe die geringere Schwellung aufwies. Diese Unterschiede zwischen der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe und der NaCl-Kontrolle sowie zwischen der mit pIRES2/IL-4/IL-10 und der mit pIRES2/EGFP behandelten Gruppe waren allerdings nicht signifikant ( $p=0,520$ ;  $p=0,100$ ). Die am Tag 3 gemessene Differenz zwischen den Gruppen wurde im Laufe des Versuches geringer, bis am Tag 21 die Gelenkschwellung in allen drei Gruppen gleich groß ausgeprägt war. Die zu diesem Zeitpunkt gemessenen

Werte lagen nur wenig über den Ausgangswerten am Tag 0. Bei einer Wiederholung des Versuches waren Unterschiede in den drei Gruppen in Bezug auf die Schwere der Gelenkschwellung nicht feststellbar.

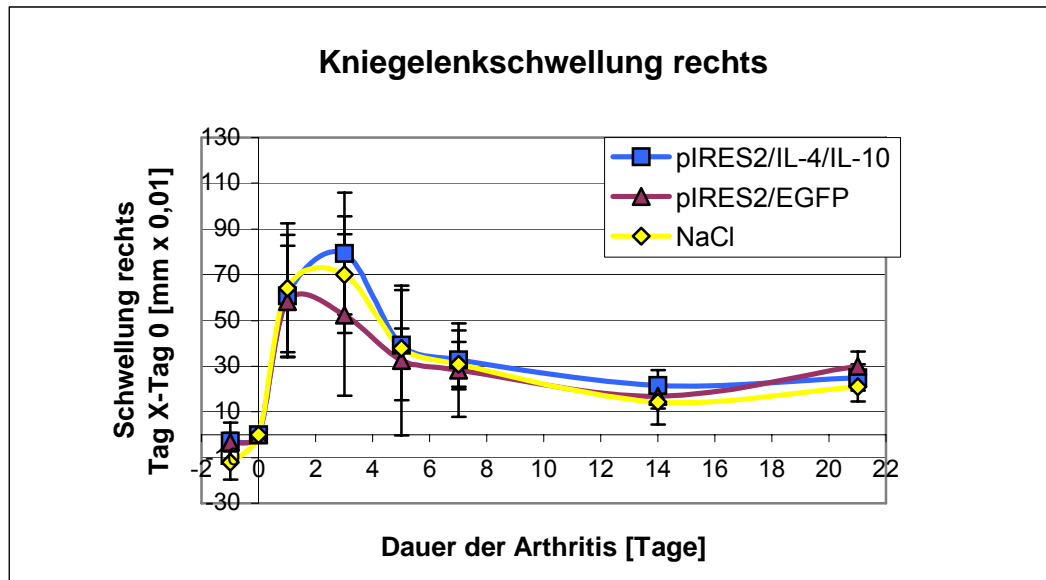


Abb. 10. Darstellung der Gelenkschwellung des rechten Kniegelenkes im Verlauf der Arthritis (Mittelwert pro Gruppe, gemessen in mm x 0,01).

#### 5.4.2 Gewichtsmessung

Das Gewicht der Tiere hatte sich in allen drei Gruppen nach einem leichten Abfall am Tag 3 bis zum Tag 21 auf Werte erhöht, die über denen am Tag 0 lagen (Abb. 11). Insgesamt war aus diesen Daten erkennbar, dass die Stärke der Entzündungsreaktion am Tag 3 ihr Maximum erreicht hatte und bis zum Tag 21 deutlich nachließ. Die Gewichtsmessung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Tiere, die mit der leicht größeren Kniegelenkschwellung korrelieren würde, zeigte sich nach der Applikation des Plasmids pIRES2/IL-4/IL-10 nicht.

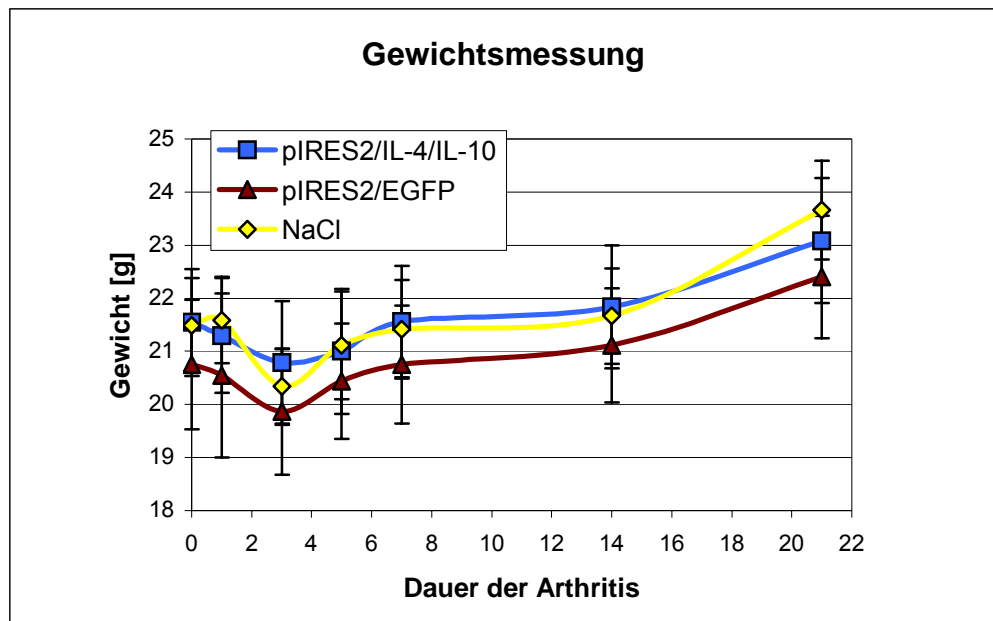


Abb.11. Darstellung des Gewichtsverlaufes beginnend am Tag 0 der Auslösung der AIA (Mittelwert pro Gruppe, gemessen in g).

### 5.4.3 DTH-Reaktion

Die DTH-Reaktion, bei der das Antigen intradermal in das Ohr jeder Maus injiziert wurde, wurde am Tag 7 ausgelöst. Die Ohrdicke wurde vor der Injektion sowie 24 h und 48 h danach gemessen. In Abb. 12 sind die Ergebnisse der Messungen jeder Gruppe dargestellt. Für alle drei Gruppen ergaben sich ähnliche Messwerte. Tendenziell zeigte aber die Gruppe, der das Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 appliziert worden war, eine stärkere DTH-Reaktion als die beiden Kontrollgruppen. Der Unterschied zu den mit dem Kontrollplasmid pIRES2/EGFP ( $p=0,045$ ) behandelten Tieren war im Gegensatz zu der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe ( $p=0,252$ ) im U-Test signifikant.

### 5.4.4 Histologische Auswertung

Die histologische Begutachtung der Entzündungsreaktion erfolgte an HE-gefärbten Gelenkschnitten. In der folgenden Abbildung (Abb. 13) wurden Gelenkschnitte des als Kontrolle dienenden linken und des entzündeten rechten Kniegelenkes von Tieren der

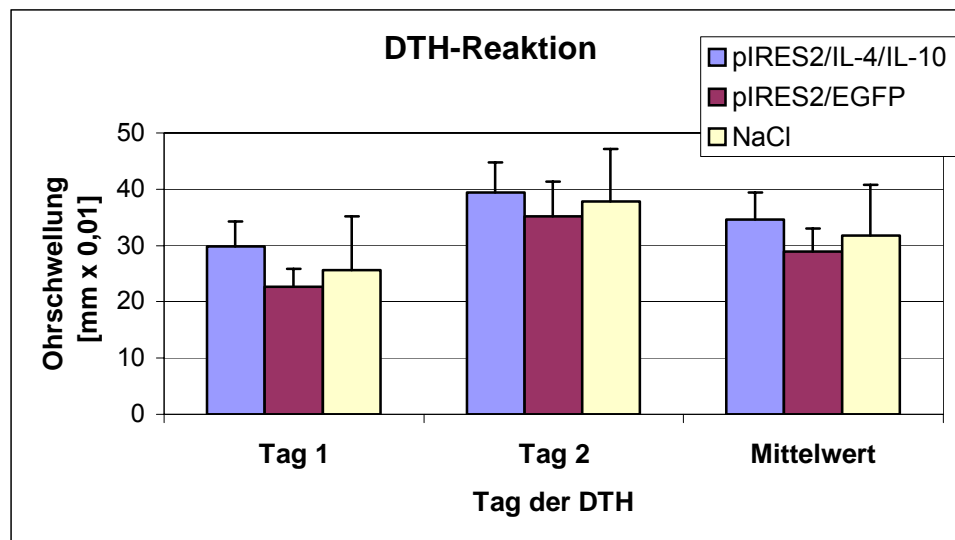


Abb. 12. DTH-Reaktion: Die Injektion des Antigens mBSA erfolgte am Tag 7 nach Induktion der AIA. Die Messung der Ohrschwellung erfolgte 24 h (Tag 1) und 48 h (Tag 2) nach der Applikation des mBSA (Mittelwert pro Gruppe; gemessen in mm x 0,01); zuletzt dargestellt ist der Mittelwert, der sich aus beiden Messungen ergibt.

mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe einander gegenübergestellt, um eine Übersicht über die entzündlichen Veränderungen im rechten Kniegelenk zu schaffen. Da sich die geringfügigen Unterschiede zwischen den drei Gruppen hinsichtlich der Pannusausbildung oder des Ausmaßes des entzündlichen Infiltrates nicht darstellen lassen, wurde hier auf einen Vergleich der Gruppen untereinander verzichtet. Die Gelenkschnitte wurden am Tag 21 der AIA angefertigt. Während die linke Spalte überwiegend intaktes Gewebe des jeweils linken Kontrollknies eines Tieres zeigt, sind in der rechten Spalte Bilder von Gelenkschnitten eines rechten arthritischen Knies zu sehen. Das Bild D zeigt eine Übersichtsaufnahme über das Kniegelenk, aus der heraus die Bilder E und F entsprechend der eingezeichneten Rechtecke vergrößert wurden. Man erkennt im Bild E an der mit Pfeil markierten Stelle gut die Verdrängung der Chondrozyten durch eindringendes Pannusgewebe sowie im Bild F die Proliferation der Synovialis. Eine Beurteilung des zellulären Infiltrates ist anhand dieser Abbildungen schwierig, zumal bis zum Tag 21 der AIA die Entzündungsreaktion stark abgeklungen war und inflammatorische Zellen nur noch in geringem Ausmaß zu erwarten sind.



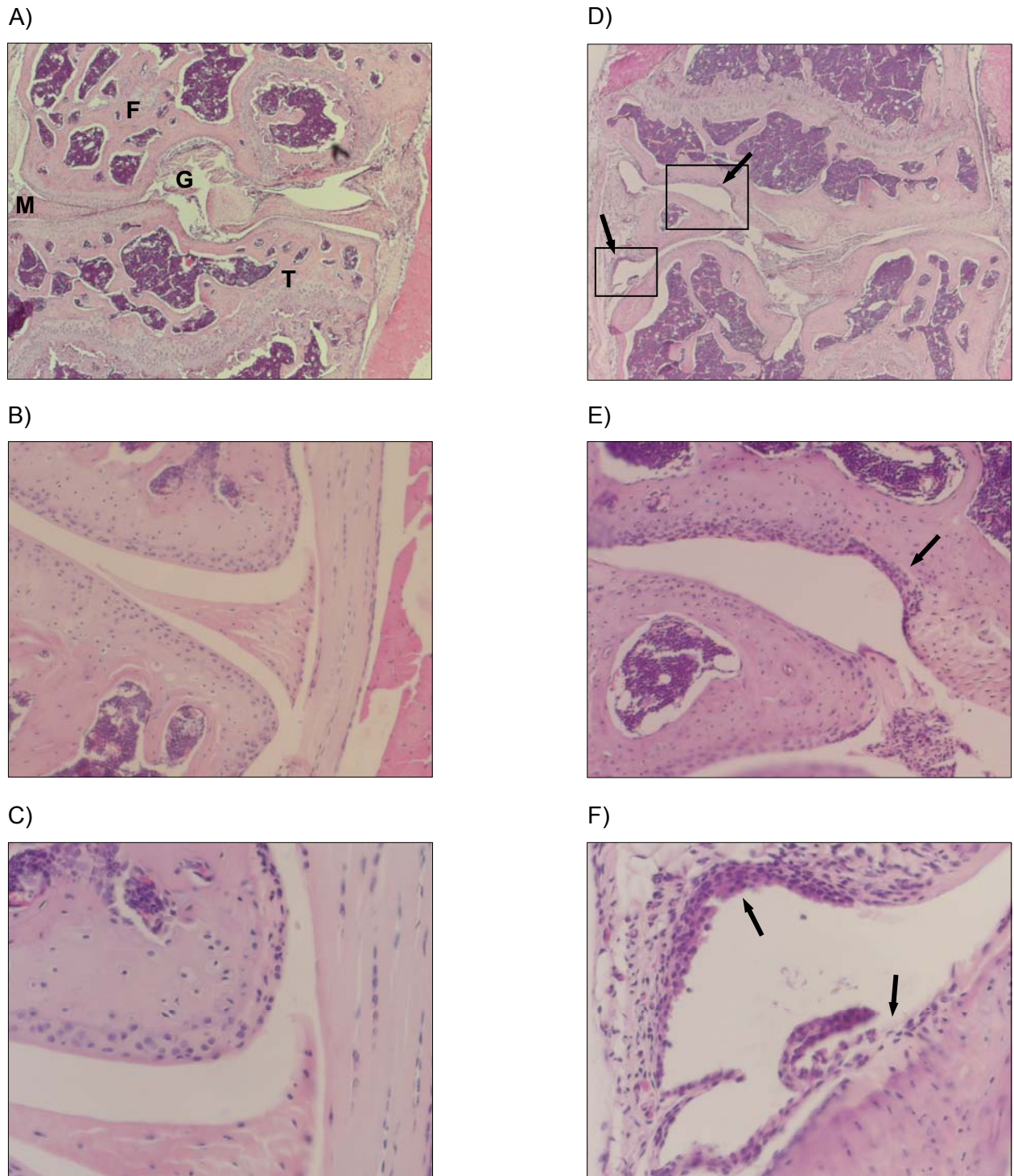


Abb. 13. Gelenkschnitte am Tag 21 der AIA von Tieren aus der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe; HE-Färbung:

Abbildungen A, B und C: Schnitte durch die jeweiligen linken Kontrollkniegelenke; weitgehend intaktes Gewebe. F=Femur, T=Tibia, G=Gelenkspalt, M=Meniskus; Vergrößerung A) 50fach, B) 200fach, C) 400fach

Abbildungen D, E und F: Schnitte durch ein arthritisches rechte Kniegelenk; D: mit Pfeil markierte Stellen weisen auf Transformation und Mehrreihigkeit der Synoviozyten sowie Knorpeldestruktion durch Pannusgewebe hin; das große Rechteck ist in der Abb. E, das kleine Rechteck in der Abb. F vergrößert dargestellt; in der Abb. E ist die Destruktion und Verdrängung von Knorpel durch das Pannusgewebe (Pfeil) erkennbar; Vergrößerung 200fach. Die Abb. F zeigt insbesondere in den mit Pfeilen markierten Bereichen eine im Vergleich zu Abb. B verdickte Synovialis; Vergrößerung 400fach.

### 5.4.5 Arthritis-Score

Die Gelenkschnitte bildeten die Grundlage für die Erstellung eines Arthritis-Scores. Als Kriterien zur Erfassung der entzündlichen Veränderungen dienten die Synovialmembran in Bezug auf Transformationen und Mehrreihigkeit, das Ausmaß des zellulären Infiltrates im Gelenkspalt, die Erosion der Knorpelzellschicht und die Größe und Aggressivität des Pannusgewebes. Die Addition der Einzelbewertungen mit einer Skala von 1 bis 4 zu einem Arthritis-Score erlaubte die Einschätzung der Entzündungsreaktion. Ein solcher Score wurde für jedes Tier einer Gruppe ermittelt, und die Werte in Tab. 8 sind als Mittelwerte jeder Gruppe zu verstehen.

Die Kontrollgruppe, der isotone Kochsalzlösung in das Gelenk injiziert worden war, wies deutlich den geringsten Arthritis-Score auf. Bei den Gruppen, denen Plasmide appliziert worden waren, lagen die entzündlichen Veränderungen mit einem halben bzw. mehr als einem Score-Punkt über der NaCl-Kontrolle. Diese Unterschiede sind allerdings nicht signifikant ( $p=0,700$ ;  $p=0,248$ ). Die Gruppe des die beiden Zytokine IL-4 und IL-10 kodierenden Plasmids wies den höchsten Arthritis-Score auf. Insbesondere die Ausbildung des Pannusgewebes war in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe am stärksten. Ein signifikant höherer Score zu den anderen beiden Gruppen ließ sich aber auch hier mittels U-Test nicht nachweisen ( $p=0,464$ ;  $p=0,101$ ).

**Tab. 8. Arthritis-Score:**

	Mesothel	Infiltrat	Pannus	Nekrosen	Gesamt-Score
Gruppe 1	1,29±0,52	0,79±0,75	0,86±0,58	0,57±0,58	3,86±0,84
Gruppe 2	1,33±0,41	0,83±0,61	0,33±0,61	0,50±0,00	3,00±1,30
Gruppe 3	1,21±0,57	0,57±0,53	0,64±0,63	0,07±0,19	2,50±1,41

Tab. 8. Arthritis-Score der einzelnen Kriterien mit einer Skala von 1 bis 4 zur Beschreibung der Entzündungsreaktion sowie die Summation zu einem Gesamt-Score für das rechte Kniegelenk (Mittelwerte pro Gruppe).

Gruppe 1: Transfektion mit pIRES2/IL-4/IL-10

Gruppe 2: Transfektion mit pIRES2/EGFP als Kontrolle

Gruppe 3: Applikation isotoner NaCl-Lösung als Kontrolle

Die histologische Begutachtung der Gelenkschnitte ergab eine Beeinflussung der Entzündungsreaktion im arthritischen Kniegelenk allein durch die Plasmidapplikation. Während die mit Plasmid behandelten Gruppen bei den Einzelbetrachtungen des Mesothel, der Infiltration und der Knorpelzellnekrosen ähnlich zu bewerten waren, zeigte die dritte Gruppe nach der Applikation isotoner NaCl-Lösung die geringste Entzündungsreaktion und Gelenkzerstörung. In der Abb. 14 ist der Arthritis-Score für das jeweils rechte Kniegelenk der Versuchstiere graphisch dargestellt.

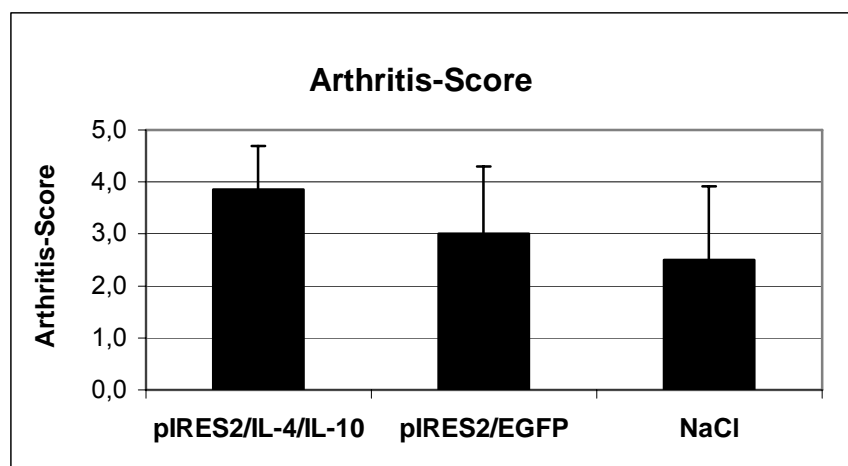


Abb. 14. Vergleich der entzündlichen Veränderungen des rechten Kniegelenkes mit Hilfe des Arthritis-Scores entsprechend der Tab. 8 (Mittelwerte pro Gruppe).

Wie sich auch schon bei der Darstellung der Gelenkschwellung und in der Gewichtskurve zeigte, die während des Versuches aufgezeichnet worden waren, war die Schwankungsbreite der Ausprägung der Entzündungsreaktion und der daraus resultierenden Gelenkdestruktion innerhalb der Gruppen relativ groß.

#### 5.4.6 Bestimmung der Immunglobulin-Konzentrationen im Serum

Das Serum der Tiere wurde am Tag 21 gewonnen. Mittels ELISA wurde die Konzentration der für die AIA wichtigen Immunglobuline bestimmt. Dazu zählen die Gesamt-IgG der Fraktionen IgG, IgG1 und IgG2b sowie die mBSA-spezifischen Antikörper IgG1,



IgG2b und IgG2a. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der IgG gegen KI und KII sowie PG gemessen.

Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des Gesamt-Immunglobulinmusters im Serum nicht wesentlich (Abb. 15). Auch die Betrachtung der Antikörper gegen das Antigen der AIA, das mBSA, ergab in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe kein verändertes Muster der IgG-Subtypen (Abb. 16).

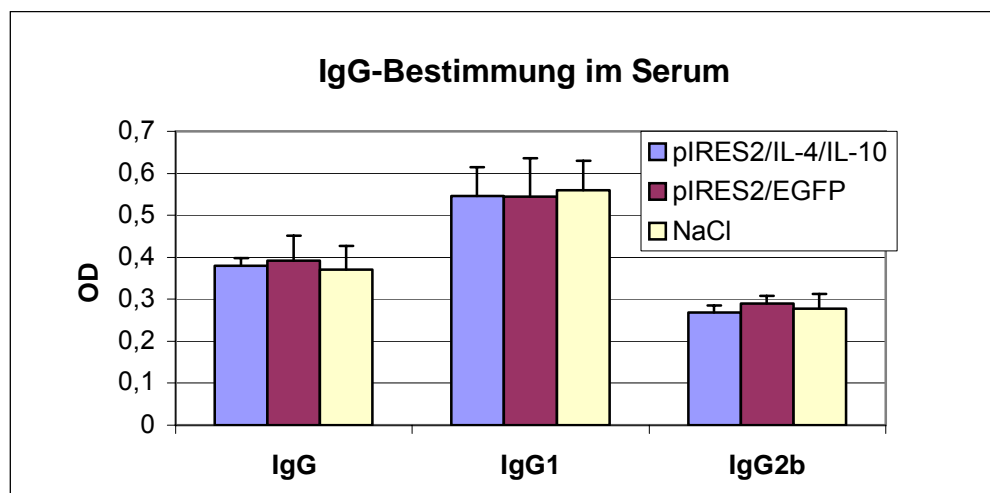


Abb. 15. Bestimmung der IgG-Konzentration aus dem Serum am Tag 21. Die Transfektion mit den Plasmiden pIRES2/IL-4/IL-10, pIRES2/EGFP bzw. die Kontrolle mit isotoner NaCl-Lösung wurde am Tag -1 vor der Arthritisinduktion durchgeführt. Bestimmt wurden das Gesamt-IgG sowie die Untergruppen IgG1 und IgG2b.

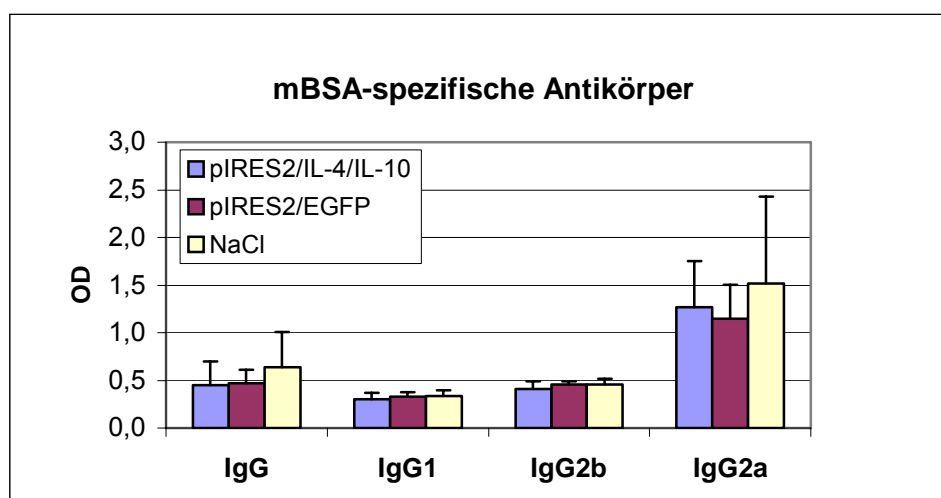


Abb. 16. Bestimmung der IgG-Konzentration aus dem Serum am Tag 21: Die Transfektion mit den Plasmiden pIRES2/IL-4/IL-10, pIRES2/EGFP bzw. die Kontrolle mit isotoner NaCl-Lösung wurde am Tag -1 vor der Arthritisinduktion durchgeführt. Bestimmt wurden die mBSA-spezifischen Gesamt-IgG sowie die Untergruppen IgG1 und IgG2b und IgG2a.

Die Matrix-spezifischen Immunglobuline des Typs IgG gegen KI und KII und gegen PG waren in den drei Gruppen zu annähernd gleichen Konzentrationen im Serum enthalten (Abb. 17).

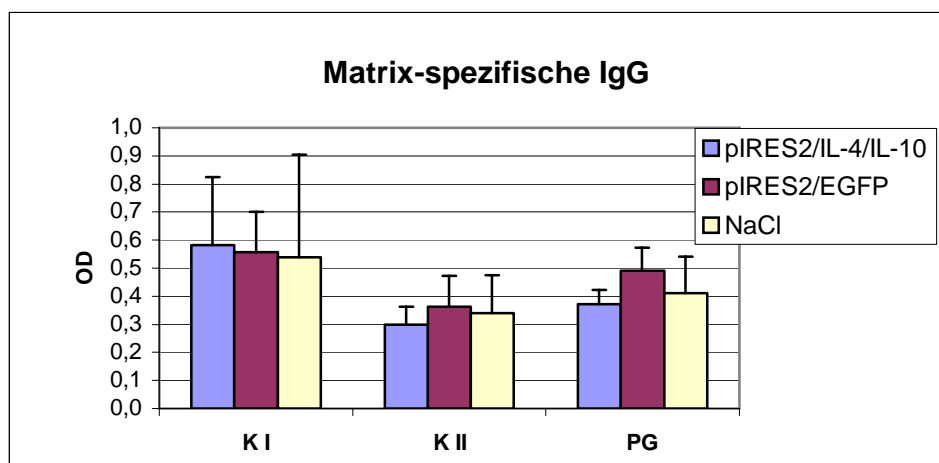


Abb. 17. Bestimmung der Immunglobuline der Fraktion IgG aus dem Serum am Tag 21. Die Transfektion mit den Plasmiden pIRES2/IL-4/IL-10, pIRES2/EGFP bzw. die Kontrolle mit isotoner NaCl-Lösung wurde am Tag -1 vor der Arthritisinduktion durchgeführt. Das Serum der Tiere wurde am Tag 21 gewonnen. Bestimmt wurden die spezifischen Gesamt-IgG gegen KI und KII sowie gegen PG.

Insgesamt betrachtet ergaben sich bei der Immunglobulinbestimmung aus dem Serum weder beim Gesamt-IgG noch bei den für die AIA spezifischen IgG auffällige Unterschiede zwischen der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe und den beiden Kontrollgruppen. Auch die Bestimmung der Subklassen des IgG, die die systemische Stärke der Th1- bzw. Th2-Reaktion belegen sollte, ergibt keinen Hinweis auf einen immunmodulatorischen Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-10.

#### 5.4.7 Makrophagenfunktionstest

Bei jeweils 5 Tieren jeder Gruppe wurden peritoneale Makrophagen entnommen, um ihre Grundaktivität und mittels Stimulationstests ihre Aktivierbarkeit zu bestimmen. Diese Stimulationstests wurden mit IFN- $\gamma$  und LPS in unterschiedlichen Dosierungen

durchgeführt. Im Überstand wurde die Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 IL-10 und IL-12 sowie die NO-Konzentration gemessen. Anhand des erhöhten Zytokingehaltes nach den Stimulationen war der Erfolg dieser Behandlung nachgewiesen (Abb. 18).

Bei der Betrachtung des IL-1 $\beta$ -Gehalts im Überstand der unstimulierten Makrophagen wurde eine unterschiedliche Ausgangsaktivität der Zellen in den drei Gruppen deutlich. Während die beiden Kontrollgruppen ähnlich hohe Zytokinkonzentrationen aufwiesen, war die IL-1 $\beta$ -Konzentration in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe deutlich niedriger. Diese Tendenz zeigte sich auch bei den Stimulationsversuchen mit LPS und IFN- $\gamma$  (Abb. 18 A).

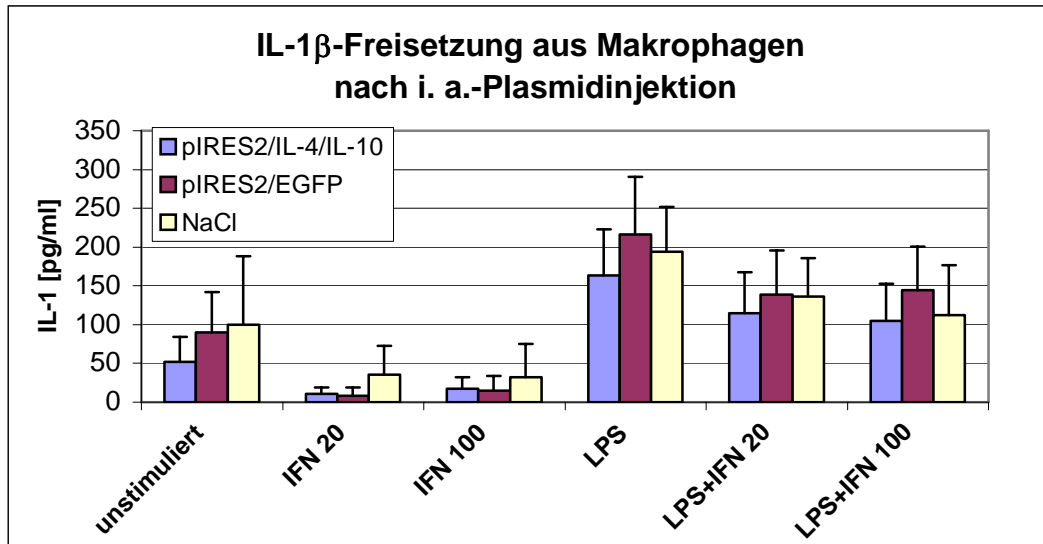
Die Abb. 18 B, in der die TNF- $\alpha$ -Bestimmung dargestellt ist, zeigt ein ähnliches Bild wie für das IL-1  $\beta$ . Hier ist der Unterschied zwischen den Zytokinkonzentrationen in den einzelnen Gruppen deutlicher ausgeprägt. Der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Makrophagenüberstand ist bei den unstimulierten Zellen der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe deutlich am niedrigsten, während die Zellen der Gruppe, der isotone NaCl-Lösung appliziert worden war, eine mehr als 5fach höhere Zytokinkonzentration und die Zellen der Gruppe, die das Kontrollplasmid erhalten hatte, eine ca. 3fach höhere Zytokinkonzentration aufwiesen. Bei den Stimulationsversuchen war dieser Unterschied aber nicht durchgängig sichtbar.

Für das IL-6 konnte keine veränderte Ausgangsaktivität in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe gefunden werden, doch hier wiesen die dieser Gruppe entnommenen Makrophagen in den Stimulationstests insbesondere bei der Kombination von LPS mit IFN- $\gamma$  tendenziell die niedrigste Zytokinkonzentration auf (Abb. 18 C).

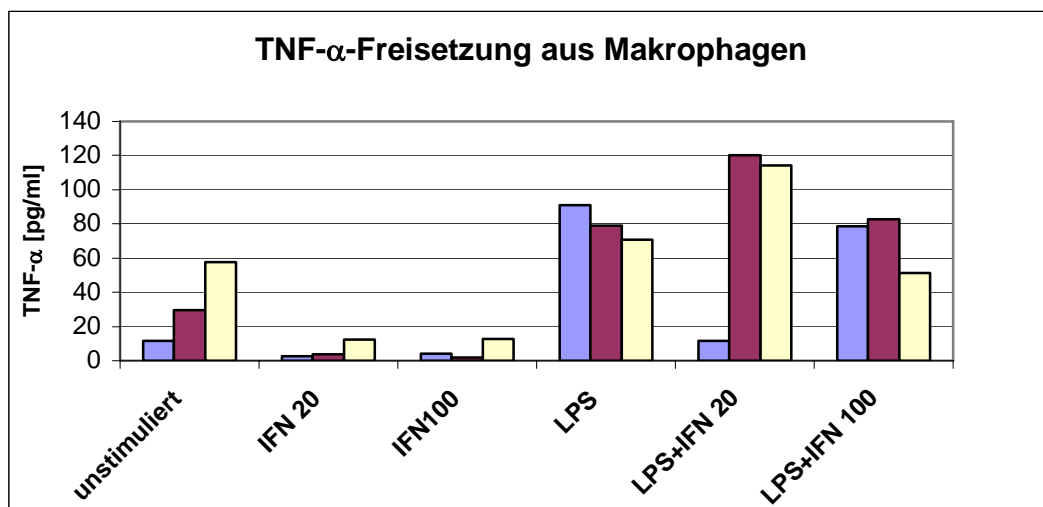
Die Bestimmung des IL-12 aus dem Makrophagenüberstand (Abb. 18 D) lässt wiederum eine ähnliche Tendenz wie beim IL-1  $\beta$  und beim TNF- $\alpha$  erkennen. Hier ist der Ausgangszustand der Makrophagen aus der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe um das 3fache niedriger als in den beiden Kontrollgruppen. Bei den Stimulationstests findet man allerdings auch hier diesen Unterschied nicht konstant, aber er zeigt sich wieder bei der Doppelstimulation mit LPS und IFN- $\gamma$ .

Für die IL-10-Konzentration im Überstand ergeben sich zwischen den drei Gruppen weder vor noch nach den Stimulationstests unterschiedlich hohe Werte (Abb. 18 E). Der IL-4-Nachweis mittels ELISA war in allen drei Gruppen nicht möglich.

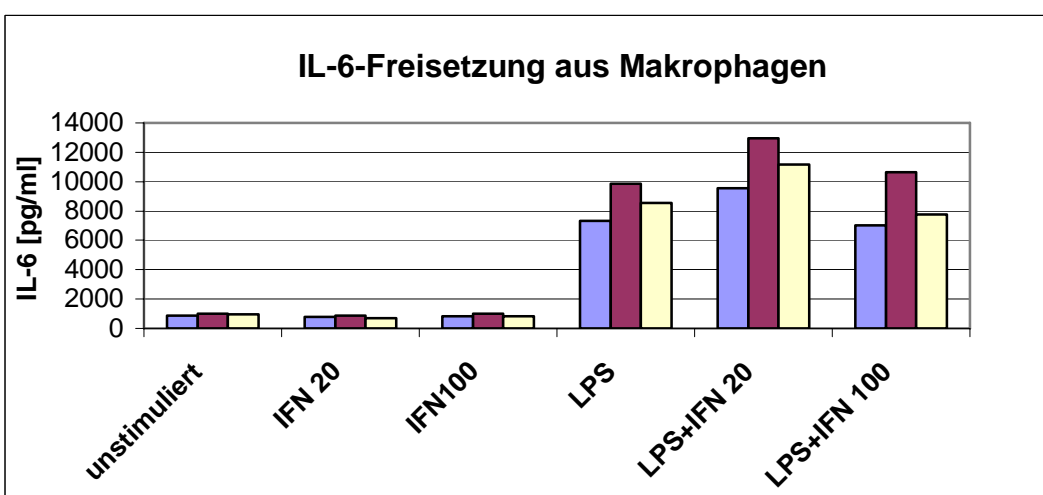
A)



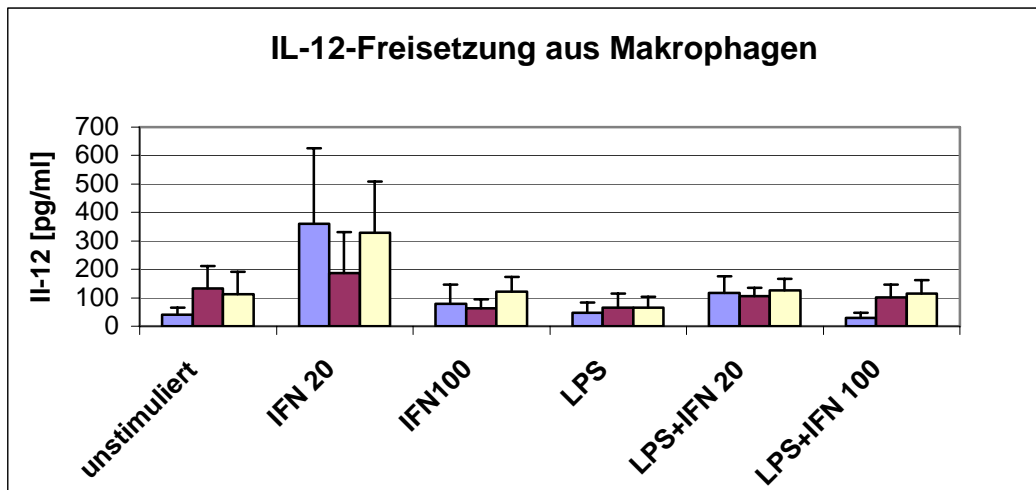
B)



C)



D)



E)

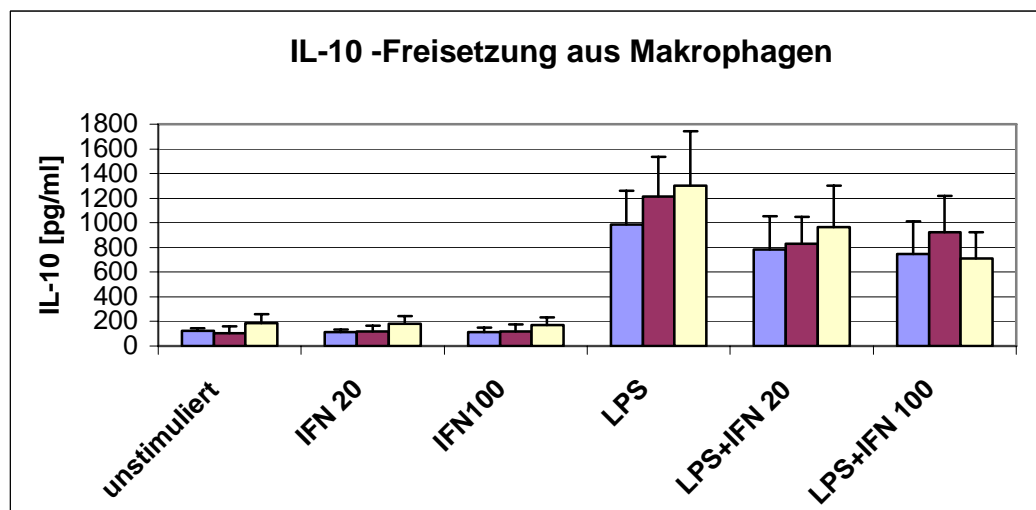


Abb. 18. Zytokinbestimmung aus dem Überstand kultivierter Makrophagen nach i. a.-Plasmid-injektion. Die Versuchstiere wurden am Tag -1 vor Arthritisinduktion mit 25 µg der Plasmide pIRES2/IL-4/IL-10, pIRES2/EGFP bzw. als Kontrolle mit NaCl transfiziert, und die Makrophagen wurden am Tag 21 der AIA aus der Peritonealhöhle entnommen. In unstimuliertem Zustand sowie nach Stimulationstests mit 20 oder 100 U/ml IFN- $\gamma$ , 1000 ng/ml LPS und nach Kostimulation mit 20 oder 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 1000 ng/ml LPS wurde eine Zytokinbestimmung mittels ELISA durchgeführt. Gemessen wurden die Konzentrationen an A: IL-1  $\beta$ , B: TNF- $\alpha$ , C: IL-6, D: IL-12 und E: IL-10. Eine Bestimmung des IL-4, das auf dem Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 kodiert ist, war in keiner der drei Gruppen sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach den Stimulationstests möglich.

Die Unterschiede hinsichtlich der Zytokinproduktion durch unstimulierte Makrophagen sowie in den Stimulationstests zeigten für die Zytokine IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12 eine ähnliche Tendenz. Die innerhalb einer Gruppe gemessenen Zytokinkonzentrationen unterlagen hierbei aber sehr starken Schwankungen. Ein zweiter Versuch, der unter konstanten Versuchsbedingungen durchgeführt wurde, konnte den veränderten Ak-

tivitätszustand der Makrophagen aus der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe nicht bestätigen (Daten nicht dargestellt). Auch die aus den Makrophagenüberständen bestimmte NO-Konzentration zeigte zwischen den drei Gruppen keinen Hinweis auf eine veränderte Aktivität nach der i. a.-Applikation des Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10. Sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach der Zugabe von LPS und IFN- $\gamma$  weist diese Gruppe keine Unterschiede zu der Kontrolle auf, der isotone NaCl-Lösung injiziert worden war (Abb. 19). Die höchsten Werte traten in der mit pIRES2/EGFP behandelten Gruppe auf.

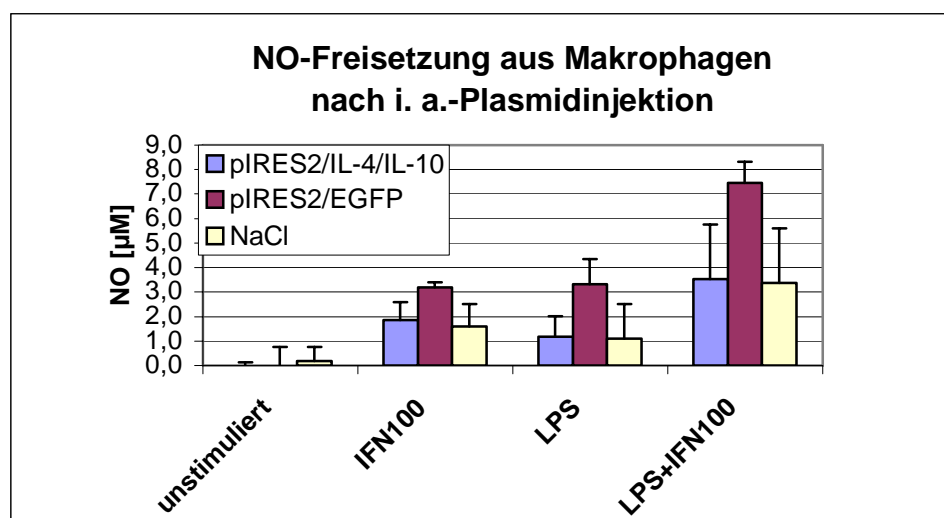


Abb. 19. NO-Bestimmung nach Stimulation peritonealer Makrophagen. Die Transfektion erfolgte durch eine i. a.-Injektion von 25 µg pIRES2/IL-4/IL-10 und pIRES2/EGFP; als Kontrolle diente isotone NaCl-Lösung. Die peritonealen Makrophagen wurden am Tag 21 nach Induktion der AIA isoliert. Dargestellt ist die NO-Produktion unstimulierter Makrophagen sowie die NO-Produktion nach Stimulation mit 100 U/ml IFN- $\gamma$ , 1000 ng/ml LPS und nach Kostimulation mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 1000 ng/ml LPS.

### 5.5 In-vitro-Transfektion peritonealer Makrophagen

Aus naiven Mäusen wurden peritoneale Makrophagen isoliert, mit denen anschließend eine Transfektion mit den Plasmiden pIRES2/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 durchgeführt wurde. Als Kontrolle wurde wie bei den In-vivo-Versuchen isotone NaCl-Lösung

verwendet. Zunächst sollte fluoreszenzmikroskopisch das EGFP auf dem Kontrollplasmid pIRES2/EGFP als Hinweis auf den Erfolg der Transfektion nachgewiesen werden. Der Nachweis dieses Reportergens gelang jedoch nicht. Der Erfolg der Transfektion der Makrophagen mit pIRES2/IL-4/IL-10 ist somit nicht sicher. Darüber hinaus wurde eine Zytokinbestimmung im Überstand der Makrophagen durchgeführt. Dabei wurde auf die Stimulationstests verzichtet. Bei diesem Versuch wurde zunächst nur ein ELISA zur Detektion der Zytokine IL-4 und IL-10, die auf dem Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 kodiert sind, durchgeführt. Beide Zytokine waren hier nicht nachweisbar. Aufgrund dieses negativen Ergebnisses erfolgten keine weitere Zytokinbestimmungen. Als letztes wurde noch eine Bestimmung der NO-Konzentration durchgeführt, bei der keine Unterschiede in den drei Gruppen deutlich wurden.

Der Transfektionserfolg der Makrophagen in vitro war weder fluoreszenzmikroskopisch noch durch die Bestimmung der auf dem transfizierten Plasmid kodierten Zytokine mittels ELISA nachweisbar. Ein Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-10 auf den Aktivitätszustand der Makrophagen konnte daher hier nicht weiter untersucht werden.

## 6. Diskussion

### 6.1 Gentechnische Verfahren

Die Anwendung gentechnischer Verfahren erschließt im therapeutischen Bereich chronischer Erkrankungen neue Möglichkeiten. Man findet inzwischen sowohl präklinische (Xing et al. 1997, Prud'homme 2000, Gill et al. 2001) als auch klinische Studien (Hau- ses und Schackert 1999, Comerota et al. 2002, Hemminki und Alvarez 2002), in denen die Gentherapie die Grundlage für neue Methoden insbesondere im Bereich der Krebs- bekämpfung bildet. Auch bei der Erforschung von Behandlungsansätzen für die RA kommt die Gentherapie immer häufiger zum Einsatz (van de Loo und van den Berg 2002).

Als Träger für die genetische Information werden unterschiedliche Vektoren verwendet. Zu den wichtigsten zählen derzeit replikationsunfähige Stämme von Adeno- und Retro- viren sowie Komplexe aus Liposomen und DNA und nackte Plasmid-DNA (Nita et al. 1996). Eine weitere Möglichkeit für einen Gentransfer bietet die genetische Modifizie- rung von Zellen ex vivo und anschließende Applikation dieser Zellen in den Organis- mus. Es wurden beispielsweise Versuche mit modifizierten Makrophagen (Kluth et al. 2001), dendritischen Zellen (Morita et al. 2001) oder auch mit gentechnisch veränderten synovialen Fibroblasten durchgeführt (Müller-Ladner et al. 1999). Bei diesen Versu- chen, in denen ex vivo modifizierte Zellen als Träger genetischen Materials verwendet wurden, konnten gute therapeutische Effekte beobachtet werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wird in Zukunft auf dem Aspekt der Sicherheit der Gentherapie liegen. Es stellen sich insbesondere die Fragen, ob durch Eingriffe in das menschliche Genom Folgemutationen provoziert werden, deren Konsequenzen wie etwa eine Erhöhung des Krebsrisikos oder auch die Induktion einer Autoimmunerkrankung derzeit nicht ab- schätzbar sind, und ob durch die Applikation von DNA in den Organismus die Entste- hung von Anti-DNA-Antikörpern ausgelöst werden kann. Obwohl in großen Versuchen an Tiermodellen keine Komplikationen aufgetreten sind, wurde jetzt eine klinische Stu- die veröffentlicht, in der bei Kindern mit X-chromosomaler schwerer kombinierter Im- munschwäche (SCID-Syndrom), die sich einer Gentherapie mit Retroviren als Vektoren unterzogen, schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten (Kohn et al. 2003). Bei einigen



Patienten entwickelte sich eine Leukämie, die auf eine Reaktivierung der Retroviren zurückzuführen war. Die Risiken einer Gentherapie des Menschen sind auch durch ausgeprägte Tierversuche nicht eindeutig abzuschätzen. Die Suche nach sicheren Trägern für genetisches Material ist somit von besonderer Bedeutung.

In einer Arbeit über die derzeitigen Möglichkeiten eines Gentransfers in das Kniegelenk von Versuchstieren aus dem Jahr 1996 (Nita et al. 1996) ist eine Übersicht über die Effektivität der bisher verwendeten Vektoren aufgestellt worden. Hier wurden Retro-, Adeno- und Herpes simplex Viren (HSV), kationische Liposomen sowie nackte Plasmid-DNA in Hinsicht auf Dauer und Ausmaß der Genexpression sowie auf die inflammatorische Antwort miteinander verglichen. In dieser Studie erwiesen sich die HSV als zytotoxisch. Retroviren waren nach einer i. a.-Injektion in das Kniegelenk von Kaninchen zu keinem Zeitpunkt direkt oder über die Detektion ihres Reportergens nachweisbar. Darüber hinaus ist von Retroviren bekannt, dass sie sich in das Wirtsgenom integrieren und somit latent im Organismus persistieren (Khoury und Hanafusa 1976). Bei den Adenoviren zeigte sich eine starke Genexpression bis zum 28. Tag nach der Injektion (Pan et al. 1999). Sie erwiesen sich damit als hocheffektiv. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Adenoviren nach einer i. a.-Injektion von Typ A und Typ B Synoviozyten aufgenommen werden. Sie wirken allerdings pro-inflammatorisch, und abhängig von der applizierten Dosis der Viren sind die Effekte nicht auf das injizierte Gelenk beschränkt, sondern sind ipsilateral in der gesamten Extremität zu finden (Evans et al. 1999).

Bei Applikation der Liposomen sowie nackter Plasmid-DNA trat lediglich eine transiente Genexpression von 2 bis 3 Tagen auf; mittels PCR waren die Reportergene noch 28 bzw. 7 Tage post injectionem detektierbar (Nita et al. 1996).

## **6.2 Plasmide in der Gentechnik**

Plasmide werden seit 1990 für den Gentransfer eingesetzt. Nach einer i. m.-Injektion von Plasmid-DNA ist die Expression der DNA über viele Monate hinweg in den Skelettmuskelzellen nachweisbar. Sie wird dabei nicht ins Genom der Zellen integriert, repliziert sich nicht und geht auch keine Bindungen zu chromosomaler DNA ein (Wolff et al. 1992). Gegenüber den obengenannten viralen Vektoren haben Plasmide weiterhin den

Vorteil, dass sie am Ort der Injektion keine immunologische Reaktion mit fibrotischen Veränderungen induzieren (Raz und Watanabe 1993). Auch nach einer intradermalen Applikation (Raz et al. 1994) von Plasmiden sind sie mehrere Monate lang am Injektionsort nachweisbar und entfalten systemische Wirkung. Neuere Studien beschäftigen sich mit der Möglichkeit der i. a.-Injektion von Plasmid-DNA (Yovandich et al. 1995, Chan et al. 2002). Bei diesem Applikationsweg konnte eine Aufnahme der Plasmide durch Synoviozyten und eine anschließende Plasmidexpression über mehrere Tage nachgewiesen werden. Es fand eine Sekretion der auf dem Plasmid kodierten Reportergene in die Synovialflüssigkeit statt. Darüber hinaus sind bereits erste klinische Versuche mit Plasmiden durchgeführt worden, die eine gute Toleranz gegenüber der Applikation der Plasmid-DNA zeigten (Isner 1998, Comerota et al. 2002). Diese Erkenntnisse bringen den Plasmiden insbesondere in Hinblick auf ihre Sicherheit im Gegensatz zu viralen Vektoren einen hohen Stellenwert bei der Entwicklung neuer gentechnischer Therapieansätze ein.

### **6.3 Versuche**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob nach einer i. a.-Injektion von Plasmiden eine Transfektion von Zellen im Kniegelenk erfolgt und ob dieser Applikationsweg für die Therapie der RA genutzt werden kann. Zu diesem Zweck werden die therapeutischen Effekte einer kombinierten Applikation der Zytokine IL-4 und IL-10 am Modell der AIA untersucht.

#### **6.3.1 Transfektionserfolg in vitro**

In einem ersten Schritt wurden Plasmide kloniert, die die Zytokine IL-4 und IL-10 einzeln und in einem bicistronischen Vektor gemeinsam kodieren. Diese neuen Plasmide wurden auf ihre Transkribierbarkeit in unterschiedlichen Zelllinien hin überprüft. Der Transfektionserfolg konnte in 293-Zellen – einer humanen Nierenzellkarzinom-Linie – mit einer hohen Transfektionsrate sowohl über die Detektion des Reportergens als auch über den Zytokin-Nachweis mittels PCR gezeigt werden. Ebenfalls erfolgreich war die Transfektion von 3T3-Fibroblasten, die aber eine wesentlich schwächere Transfektionsrate

aufwiesen. Die direkte Detektion der Zytokine aus dem Überstand bzw. aus lysierten 3T3-Fibroblasten mittels ELISA war nicht durchführbar. Eine Ursache dafür könnte die aus den Bildern der Abb. 6 ersichtliche geringe Transfektionsrate dieser Zellen sein, die möglicherweise nur zu einer Zytokinexpression und -sekretion unterhalb der Nachweisgrenze geführt hat. Der Zytokin-Nachweis auf der RNA-Ebene war für alle drei klonierten Plasmide positiv.

Hinsichtlich der In-vivo-Versuche ist insbesondere der Transfektionserfolg der Fibroblasten von Bedeutung. Bei einer Injektion von Plasmid-DNA in den Gelenkspalt, der von synovialen Fibroblasten ausgekleidet ist, findet eine Plasmidaufnahme aufgrund der hohen Zellzahl sowie ihrer mitotischen Aktivität und der Fähigkeit zur Phagozytose mit größter Wahrscheinlichkeit durch Typ A-Synoviozyten statt (Yovandich et al. 1995). Die erfolgreiche In-vitro-Transfektion von Fibroblasten gibt einen Hinweis darauf, dass eine Aufnahme des Plasmids pIRES2/IL-4/IL-10 durch synoviale Fibroblasten in vivo erfolgen könnte.

### 6.3.2 Vorversuche in vivo

Die ersten Versuche einer i. a.-Injektion der Plasmide pIRES2/EGFP und pCMV- $\beta$  wurden mit dem Ziel unternommen, durch den Nachweis des jeweiligen Reportergens die Zellen zu identifizieren, die das Plasmid aufgenommen und transkribiert haben. Dies gelang mit Hilfe des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase. Nach der Injektion von 25  $\mu$ g des Plasmids pCMV- $\beta$  in das Kniegelenk einer naiven SCID-Maus konnte anhand von Gelenkschnitten das Enzym detektiert werden. Die mit einer Spezialfärbung zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase inkubierten Gelenkschnitte der transfizierten Mäuse wiesen im Gegensatz zu den Kontrollen eine Blaufärbung im Bereich der Wachstumsfuge der Tibia und im Bereich der Markräume von Tibia und Femur auf. Im Gelenkspalt und den direkt mit dem Gelenk kommunizierenden Geweben war keine Färbung sichtbar. Eine Plasmidaufnahme durch die synovialen Fibroblasten war in diesem Versuch nicht nachweisbar. Welche Zellen im Bereich der Markräume und der Wachstumsfuge die Plasmide aufgenommen und das Reportergen exprimiert haben, lässt sich hier nicht ermitteln. Eine Plasmidaufnahme findet in mitotisch aktiven Zellen erleichtert statt. Aus In-vitro-Versuchen zur Transfektion ist bereits bekannt, dass die Transfektionsrate wesentlich

höher liegt, wenn die transfizierten Zellen nur zu ca. 40-80 % konfluent sind (Sambrook et al. 1989). Da im Bereich der Wachstumsfugen das Längenwachstum der Knochen durch enchondrale Ossifikation gewährleistet wird, lässt sich vermuten, dass die Plasmidaufnahme hier durch mitotisch aktive mesenchymale Zellen erfolgt ist. Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase wurde am 5. und am 7. Tag nach der Plasmidinjektion in den Gelenkspalt detektiert. Die Blaufärbung der Gelenkschnitte war am 7. Tag gegenüber den am Tag 5 nach der Injektion angefertigten Gelenkschnitten leicht vermindert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Plasmide zumindest indirekt über ihr Reportergen für einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen nach der Injektion nachweisbar sind.

### **6.3.3 Versuche am Modell der AIA**

In einem nächsten Schritt erfolgte eine Plasmidinjektion in das Kniegelenk von Tieren mit einer AIA. Dieser Versuch wurde mit dem bicistronischen Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 durchgeführt, und als Kontrollen wurden das Ausgangsplasmid pIRES2/EGFP sowie isotone NaCl-Lösung verwendet. Die Injektion von jeweils 25  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde am Tag -1 durchgeführt, da aus vorangehenden Studien bekannt ist, dass ein größerer Effekt auftritt, wenn die Zytokine vor Beginn einer arthritischen Symptomatik appliziert werden (Kim et al. 2000). Die Auslösung der AIA war erfolgreich, wie sich aus den Messungen der Kniegelenkschwellung sowohl im Seitenvergleich (Daten nicht dargestellt), als auch im Vergleich des Versuchsverlaufes zum Tag 0 der Arthritisinduktion ergibt. Auch die histologische Auswertung der Gelenkschnitte, die am Tag 21 angefertigt wurden, zeigt ein für die chronische Phase der AIA typisches Bild.

#### **6.3.3.1 Lokale Wirkungen**

Zur Erfassung von lokalen Wirkungen der Zytokinexpression wurde die Schwellung des rechten Kniegelenkes vor, zum Zeitpunkt der Auslösung und in zweitägigem Abstand danach bis zum Tag 21 bestimmt. Ein Vergleich der drei Gruppen untereinander zeigt keine signifikanten Unterschiede im Versuchsverlauf. Tendenziell scheint die Kontrollgruppe, der das Ausgangsplasmid appliziert wurde, die geringste Gelenkschwellung aufzuweisen, während die Gruppe 1 mit dem Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 im Durchschnitt eine stärkere Gelenkschwellung zeigt. In Versuchen an einem anderen Tiermodell der RA ergeben sich Hinweise darauf, dass insbesondere das IL-4 in niedriger Do-

sis pro-inflammatorische Effekte hat (Lubberts et al. 1999), während es in hohen Konzentrationen eine anti-inflammatorische Wirkung erzielen kann. Auch bei therapeutischer Gabe des IL-4 wird im Gegensatz zu einer prophylaktischen Applikation eine Inhibition der Entzündungsreaktion beobachtet (Kim et al. 2000). Das IL-10 scheint ebenfalls pro- und anti-inflammatorische Effekte zu haben. So kann die Entzündungsreaktion durch die Verstärkung der Leukozyteninfiltration intensiviert werden. Andererseits bewirkt eine IL-10-Überexpression im Kniegelenk eine starke Suppression der Arthritis im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) (Apparailly et al. 1998, Miyata et al. 2000). Da die Verstärkung der Gelenkschwellung allerdings bei der Wiederholung dieses Versuches nicht nachweisbar war, ist dieser Unterschied nicht sicher auf den Einfluss der applizierten Zytokine zurückzuführen. Auch der Vergleich zwischen den beiden Gruppen, denen Plasmide appliziert wurden, und der Kontrollgruppe mit isotoner NaCl-Lösung zeigt keinen Unterschied hinsichtlich der Gelenkschwellung. Eine Verstärkung der Entzündungsreaktion in der akuten Phase findet durch die Applikation von Plasmid-DNA nicht statt.

Die HE-gefärbten Gelenkschnitte, die am Tag 21 angefertigt wurden, zeigten im Seitenvergleich bei allen drei Gruppen eine erfolgreiche Arthritisinduktion. Die Gelenkveränderungen in allen drei Gruppen wurden anhand von mehreren Kriterien in einem Arthritis-Score erfasst, der sich insgesamt in den Gruppen nur wenig unterscheidet. Den geringsten Gesamt-Score hat die Kontrollgruppe, der isotone NaCl-Lösung appliziert wurde. Einen halben Scorepunkt mehr hat die zweite Kontrolle mit pIRES2/EGFP, während die Gruppe, der pIRES2/IL-4/IL-10 in das Kniegelenk injiziert wurde, die stärksten Zeichen einer Entzündung und Gelenkdestruktion aufweist. Auch bei der Betrachtung der Einzelkriterien insbesondere der Pannusbildung und der Knorpelzellnekrosen sind die Werte dieser Gruppe am höchsten.

Die Applikation der Zytokine IL-4 und IL-10 kann im Tiermodell der RA zu einer Verminderung der Chondrozytenuntergänge und des Pannusgewebes führen. Diese knorpelprotektive Wirkung konnte auf eine Verminderung der MMP-Produktion bzw. auf eine Veränderung der Balance zwischen MMPs und deren Antagonisten TIMPs am Ort der Entzündung zurückgeführt werden. Als Folge davon war der Proteoglykanabbau deutlich vermindert, die Neusynthese von Proteoglykanen war gesteigert, und Knorpelzelluntergänge traten seltener auf (Apparailly et al. 1998, Lubberts et al. 1999). Darüber

hinaus konnte mit Hilfe von röntgenologischen Untersuchungen eine Knochenprotektion durch das IL-4 nachgewiesen werden (Boyle et al. 1999, Woods 2001). Die Invasion der synovialen Fibroblasten in den Gelenkknorpel scheint durch das IL-10 vermindert zu werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Applikation von IL-10 die Proliferation humaner synovialer Fibroblasten, die einem Patienten mit RA entstammten, inhibieren kann (Müller-Ladner et al. 1999).

Während in diesem Versuch die leicht verstärkten entzündlichen Veränderungen, die im ersten Versuch am Tag 21 nach Arthritisinduktion bestimmt wurden, als ein Hinweis auf eine Zytokinwirkung gewertet werden können, fehlen die obengenannten parallel dazu gefundenen Effekte der Zytokinapplikation auf die Knorpel- und Knochenintegrität. Eine Wirkung der Zytokinexpression vom Plasmid aus lässt sich weder aus den während der akuten noch während der chronischen Phase der Entzündung bestimmten Parametern eindeutig ableiten.

#### **6.3.3.2 Systemische Wirkungen**

Neben der lokalen Wirkung einer Zytokinexpression nach der Plasmidapplikation in das Kniegelenk wurden die systemischen Effekte der Interleukine IL-4 und IL-10 untersucht.

Am Tag 7 wurde eine DTH-Reaktion ausgelöst, bei der den Tieren das Antigen der AIA, mBSA, intradermal ins Ohr appliziert wurde. Die Ohrschwellung wurde 24 h und 48 h nach der Injektion gemessen. Hier zeigte sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit pIRES2/EGFP-Applikation eine signifikant stärkere DTH-Reaktion in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe. Der Unterschied zu der NaCl-Kontrolle ist allerdings nicht signifikant, so dass aus diesem Ergebnis nicht sicher ein Einfluss durch das IL-4 und das IL-10 abzuleiten ist. Die DTH-Reaktion wird insbesondere über das IFN- $\gamma$  vermittelt, das durch Th1- und Natürliche Killerzellen gebildet wird (Kobayashi et al. 2001). Als Ausdruck einer Verschiebung der Immunreaktion vom Th1- zu einem Th2-Muster durch die synergistische Wirkung des IL-4 und des IL-10 hätte man folglich eine Verminderung der DTH-Reaktion erwarten können. In diesem Versuch zeigte sich allerdings nach Antigenapplikation eine Verstärkung der DTH-Reaktion in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe. Der Unterschied zu den beiden Kontrollgrup-

pen ist nicht einheitlich signifikant, so dass eine Veränderung des allgemeinen Immunstatus der Tiere durch die i. a.-Plasmidinjektion nicht gesichert werden kann.

Als weiterer Parameter wurde am Tag 21 nach der AIA-Induktion eine Immunglobulinbestimmung aus dem Serum durchgeführt. Von besonderem Interesse war hier, ob eine Verschiebung der IgG-Subklassen erkennbar war, die als Ausdruck einer Verschiebung von der Th1- zu einer Th2-Immunreaktion bewertet werden kann. Ein Unterschied hinsichtlich der IgG sowie im speziellen der Subklassen IgG1, IgG2b und IgG2a war zwischen den drei Gruppen allerdings weder bei der Bestimmung der Gesamt-IgG noch bei der Betrachtung der mBSA-spezifischen Antikörper zu erkennen. Bei einer durch die Zytokinwirkung hervorgerufenen Hemmung der Th1-Reaktion und Verstärkung einer Th2-Reaktion wäre in der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe ein erniedrigtes IgG2a zu erwarten gewesen. Eine entsprechende Verschiebung konnte am Modell der CIA nach systemischer Applikation des IL-4 durch ein Adenovirus bzw. des IL-10 durch ein Plasmid nachgewiesen werden. Hier verschob sich das Verhältnis von IgG1 zu IgG2 gegen das Antigen KII zugunsten des IgG1 (Apparailly et al 1998, Miyata et al. 2000). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestimmungen der spezifischen Antikörper gegen KI und KII und gegen PG zeigte sich zwischen den drei Gruppen kein Unterschied, der einen Hinweis auf eine verminderte Destruktion der Knorpelmatrix und eine geringeren Antikörperbildung gegen knorpelspezifische Antigene geben könnte.

Zusätzlich zu der DTH-Reaktion und der Bestimmung der Immunglobuline im Serum wurden peritoneale Makrophagen isoliert und ihre Grundaktivität sowie mit Hilfe von Stimulationstests ihre Aktivierbarkeit bestimmt. Als Parameter diente hier das Zytokinemuster der Makrophagen im Ruhezustand und nach Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$ . In einem ersten Versuch erschien der Ruhezustand der Makrophagen in den einzelnen Gruppen leicht unterschiedlich zu sein (Abb. 18). So wurde im Überstand der Makrophagen, die aus der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe isoliert wurden, bei einem Zytokinnachweis eine deutlich geringere Konzentration der für die Th1-Immunreaktion spezifischen Zytokine IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12 gefunden, die gegenüber den Kontrollen um das bis zu zehnfache erniedrigt war. Dieser Unterschied ließ sich allerdings weder in einem zweiten Versuch reproduzieren, noch war hier bei der Bestimmung der Zytokine IL-4 oder IL-10 ein Unterschied zwischen den drei Gruppen erkennbar. Das Zytokin IL-4 war in keinem Fall detektierbar. Bei einer NO-Bestimmung

nach Stimulation der Makrophagen mit IFN- $\gamma$  und LPS zeigte sich zwischen den drei Gruppen kein Hinweis auf einen durch die Zytokinapplikation veränderten Aktivitätszustand. Diese Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluss über den Zytokineinfluss auf die Makrophagenfunktion zu. Eine mögliche Veränderung des Zytokinmusters von Makrophagen durch lokale Wirkung des IL-4 und des IL-10 und eine dadurch induzierte systemische Th2-Immunreaktion muss daher in weitergehenden Projekten untersucht werden.

Auf der Grundlage des im ersten Versuch bestimmten Unterschiedes im Zytokinmuster wurde ein In-vitro-Versuch durchgeführt, in dem überprüft wurde, ob die In-vivo-Transfektion auf Makrophagen Auswirkungen hat. Es wurden aus naiven Mäusen Makrophagen isoliert und mit Hilfe des Effectene TR eine Transfektion sowohl mit dem Ausgangsplasmid pIRES2/EGFP als auch mit pIRES2/IL-4/IL-10 durchgeführt. Bei den mit dem Ausgangsplasmid transfizierten Makrophagen ließ sich fluoreszenzmikroskopisch nach 24 h kein EGFP nachweisen. Darüber hinaus war aus dem Überstand der Makrophagen, die mit pIRES2/IL-4/IL-10 transfiziert wurden, kein IL-4 und IL-10 detektierbar. Da weder das Reportergen EGFP in den Zellen noch die auf dem Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 kodierten Zytokine im Überstand nachweisbar waren, war eine erfolgreiche Transfektion der Makrophagen in vitro fraglich. Als Aktivitätsparameter wurde noch eine NO-Bestimmung im Überstand durchgeführt, die in allen drei Gruppen ähnliche Konzentrationen ergab. Da der Erfolg der In-vitro-Transfektion der Makrophagen nicht gesichert war, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, mit den Makrophagen einen Stimulationstest wie nach der i. a. Plasmidapplikation durchzuführen. Die Wirkung der Zytokine IL-4 und IL-10 auf den Aktivitätszustand der Zellen in vitro konnte dementsprechend hier nicht näher charakterisiert werden.

Im Hinblick auf die i. a.-Injektion des Plasmids pIRES2/IL-4/IL-10 ergeben sich aus den In-vitro-Versuchen keine Hinweise für den Einfluss der Zytokinapplikation auf die Makrophagen. In anderen Studien konnte im Serum und im injizierten Kniegelenk eine eindeutige Verschiebung des Zytokinmusters hin zu einer Th2-Immunreaktion gezeigt werden. Nach Applikation der Zytokine IL-4 und IL-10 war die Konzentration des IL-1 $\beta$  systemisch und auch lokal im Gelenk vermindert (Ma et al. 1998, Lubberts et al. 1999). Auch eine Verminderung des TNF, des IL-12 und IL-17 konnten als Zeichen einer Inhibition der Th1-Reaktion gefunden werden. Hier zeigte sich, dass das IL-10 ins-



besondere die Bildung des IL-1 $\alpha$  und des TNF- $\alpha$  inhibiert, aber geringeren Einfluss auf die IL-1 $\beta$ - und IL-12-Produktion im Synovialgewebe ausübt (Lubberts et al. 2000). Das IL-4 hingegen vermindert insbesondere die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und fördert die Expression des IL-1RA (Miossec et al. 1992, Chomarat et al. 1995).

Ein Vergleich der Wirkungen, die eine Applikation der Zytokine IL-4 und IL-10 in vorangehenden Studien erzielte, mit den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit zeigt bei keinem der gemessenen Parameter ein sicheres Zeichen für eine Zytokinwirkung. Im Vergleich der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe mit der Kontrollgruppe, die das Ausgangsplasmid bekam, sowie der mit NaCl behandelten Kontrolle sind weder im Bereich der lokalen noch der systemischen Parameter der Arthritis signifikante Unterschiede durch das Plasmid pIRES2/IL-4/IL-10 erkennbar. Ob eine Plasmidaufnahme durch Zellen im Bereich des Kniegelenkes der Versuchstiere erfolgt ist, lässt sich somit nicht klären. Dementsprechend lassen sich auch keine Aussagen darüber treffen, ob eine Zytokinexpression vom Plasmid ausgehend erfolgt ist und ob die transfizierten Zellen dazu in der Lage sind, diese Zytokine in die Synovialflüssigkeit auszuschleusen. Möglicherweise war die Menge der applizierten Plasmide an sich zu gering, um Effekte im Kniegelenk auslösen zu können. Die Vorversuche haben gezeigt, dass eine Plasmidaufnahme durch Zellen nach i. a.-Injektion erfolgen kann. In diesem Versuch waren die transfizierten Zellen allerdings nicht direkt im Kniegelenk, sondern periartikulär im Bereich der Wachstumsfuge und der Markräume der angrenzenden Knochen zu finden. Falls in den Versuchen am Modell der AIA analog eine Plasmidaufnahme durch periartikulär gelegene Zellen erfolgt ist, lässt sich das Ausbleiben von Effekten der Zytokine auch durch die vom Kniegelenk entfernte Zytokinexpression erklären. Die Halbwertszeit der Zytokine im Organismus ist extrem kurz, so dass eine Zytokinproduktion auch in geringer Entfernung vom Ort der Entzündungsreaktion möglicherweise keinen Effekt mehr auf das entzündliche Geschehen haben kann. Durch eine Steigerung der applizierten Plasmidkonzentration könnte diese Fragestellung überprüft werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus den Ergebnissen der In-vitro-Versuche. Hier konnte insbesondere bei der Transfektion von 3T3-Fibroblasten trotz der Verwendung von Transfektions-unterstützenden Reagenzien nur eine geringe Transfektionsrate erzielt werden. Eine Transfektion von Synoviozyten mit Plasmiden ist in vorangehenden Studien erfolgreich verlaufen. Wenn aber die Transfektionsrate der Synoviozyten ebenfalls gering ist, dann war möglicherweise die applizierte Plasmidmenge nicht ausrei-

chend, um genügend Zellen zu transfizieren. Die so produzierte Zytokinmenge kann aufgrund dessen unterhalb einer wirksamen Dosis gelegen haben, wodurch kein Einfluss auf die Immunreaktion im Kniegelenk ausgeübt wurde. Systemische Effekte, wie sie bei der Applikation von hohen Dosen von Viren als Träger für die Zytokine beobachtet wurden, sind somit ebenfalls nicht zu erwarten.

Über die Sicherheit einer Applikation von Plasmiden in das Kniegelenk lässt sich auch keine Aussage treffen. In diesen Versuchen war nach der Applikation des Ausgangsplasmids pIRES2/EGFP kein wesentlicher Unterschied zu der NaCl-Kontrolle feststellbar, der auf einen Einfluss der Fremd-DNA auf die Entzündungsreaktion schließen lässt. Wenn man allerdings von einer zu geringen Konzentration an injizierten Plasmiden ausgeht, relativiert sich dieses positive Ergebnis in dem Sinne, dass eine mögliche Beeinflussung durch die Fremd-DNA aufgrund der zu geringen Menge ausgeblieben ist. Vorangehende Versuche, in denen Plasmide i. a. injiziert wurden, deuten allerdings darauf hin, dass die Applikation der Plasmide keine Verstärkung der Entzündungsreaktion hervorruft (Chan et al. 2002).

Darüber hinaus wurden die Vorversuche an gesunden Tieren durchgeführt, in denen der allgemeine Immunstatus sowie die Situation im Kniegelenk nicht mit der vergleichbar ist, die bei den arthritischen Tieren herrscht. Daher sind die positiv verlaufenen Vorversuche lediglich als ein Hinweis darauf zu deuten, dass eine Plasmidaufnahme durch Zellen nach i. a.-Injektion möglich ist. In einem arthritischen Kniegelenk mit Infiltration durch Entzündungszellen finden Abbauprozesse der applizierten Fremd-DNA wahrscheinlich schneller statt, so dass hier eine im gesunden Kniegelenk ausreichende Plasmidkonzentration für eine erfolgreiche Transfektion von Zellen zu gering sein kann.

#### **6.4 Kombination der Zytokine IL-4 und IL-10**

Die Kombination der beiden Zytokine für eine Therapie der RA erscheint aufgrund ihres Synergismus bei der Verschiebung der Balance zwischen Th1- und Th2-Immunreaktion vielversprechend. Eine Studie aus dem Jahr 1998 (Lubberts et al. 1998) hat bei einer gemeinsamen Applikation der beiden Zytokine IL-4 und IL-10 in einem Arthritismodell wesentliche Verbesserungen hinsichtlich der Gelenkschwellung sowie der Proteoglykan-Neusynthese und auch eine deutlichere Verminderung der Zytokine der Th1-

Immunantwort wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gezeigt. Diese Kombination konnte die Effekte einer alleinigen IL-4- oder IL-10-Applikation deutlich steigern.

### **6.5 Übertragung auf die RA**

Die Wirkung einer systemischen oder lokalen Applikation der Zytokine IL-4 und IL-10 wurden bereits in vielen Studien untersucht. Als Tiermodelle für die RA dienten hier unterschiedliche Arthritis-Formen wie z. B. die in dieser Arbeit verwendete AIA oder auch die CIA. Es konnte anhand lokaler Parameter wie Schwere der Arthritis und Ausmaß der Knorpel- und Knochenerosion sowie anhand systemischer Wirkungen auf den Immunstatus gezeigt werden, dass das IL-4 wie auch das IL-10 die Erkrankung günstig beeinflussen.

Eine Möglichkeit, diese positiven Wirkungen vom Tiermodell auf die RA zu übertragen, bietet ein Tiermodell mit SCID-Mäusen. Hier wird eine Koimplantation von Synoviozyten bzw. von synovialem Gewebe, die zuvor Patienten mit RA entnommen wurden, zusammen mit humanem Knorpel in den Organismus von SCID-Mäusen vorgenommen (Geiler et al. 1994). An diesem Modell wurden Studien zur molekularen und zellulären Interaktion zwischen rheumatoidem Synovium und Knorpel durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere das IL-10 eine Inhibition sowohl der Einwanderung von Synoviozyten in den Knorpel als auch die Verminderung der durch diese Zellen verursachten Knorpeldestruktion bewirkt (Müller-Ladner et al. 1999). Die Erfolge der Applikation von IL-10 übersteigen die Effekte, die durch Gabe von löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptoren erzielt werden konnten. Auch in einer weiteren Studie an diesem Modell konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Hier wurde zusätzlich die Einwanderung von Monozyten in das Synovium untersucht. In dieser Arbeit konnten für die einzelne Applikation von IL-4 oder IL-10 sowie für die kombinierte Gabe eine deutliche Verminderung der Knorpeldestruktion und der Monozytenimmigration festgestellt werden (Jorgensen et al. 1998). Diese Studien geben einen Hinweis darauf, dass die Gabe von IL-4 und IL-10 auch beim Menschen therapeutisch nutzbar gemacht werden kann.

Bis zu einer klinischen Anwendung der beiden Zytokine muss die Frage der Sicherheit einer Zytokinapplikation und ihrer systemischen Nebenwirkungen näher untersucht

werden. Es ist bereits bekannt, dass die lokale Gabe von insbesondere IL-10 ipsilaterale Effekte in anderen Gelenken hervorruft (Lechman et al. 1999, Whalen et al. 1999, Lubberts et al. 2000). Selbst bei einem Gentransfer direkt in das Kniegelenk hinein sind also systemische Effekte nicht auszuschließen. Ursachen für diese systemischen Wirkungen können in einer Zytokinverteilung im Organismus über das Blut- oder Lymphsystem mit Effekten auf immunkompetente Zellen insbesondere in den Lymphknoten sein. Eine andere Erklärung ist die Aufnahme der applizierten Fremd-DNA durch immunkompetente Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen, die systemisch durch ihre kontinuierliche Zytokinproduktion Einfluss auf den Immunstatus nehmen (van de Loo und van den Berg 2002). In dieser Arbeit ist diese Möglichkeit untersucht worden, indem zum einen peritoneale Makrophagen auf ihren veränderten Aktivitätszustand hin überprüft wurden. Zum anderen wurde in einem anschließenden Versuch eine In-vitro-Transfektion von Makrophagen mit dem Ziel einer näheren Charakterisierung der Zytokineffekte versucht. Eine Expression des Reprotergens war aber fluoreszenzmikroskopisch nicht nachzuweisen, und auch eine Produktion von IL-4 und IL-10 konnte nicht gezeigt werden, so dass hier keine weiteren Funktionsuntersuchungen durchgeführt werden konnten. Dadurch lässt sich in diesem Versuch nicht klären, ob eine Plasmidaufnahme durch Makrophagen in vivo erfolgt, über die systemische Effekt vermittelt werden können. Bei der Verwendung anderer Vektoren für den Gentransfer ist diese Möglichkeit der systemischen Zytokinverbreitung allerdings nicht auszuschließen.

## **6.6 Nebenwirkungen einer Zytokinapplikation**

Es stellt sich insbesondere die Frage, ob eine systemische Wirkung der Zytokine schwerwiegende Nebenwirkungen hervorruft. Bezüglich einer Applikation des IL-10 in den menschlichen Organismus gibt es bereits zahlreiche Studien, die die Unbedenklichkeit einer solchen Zytokingabe nahe legen. Eine intravenöse Dosis von rekombinantem IL-10 in gesunden Probanden hatte in einem Projekt von Fuchs et al. eine transiente Leukozytose sowie die 24 h andauernde Verminderung der Produktion von IL-6, IL-8 und IFN- $\gamma$  zur Folge (Fuchs et al. 1996). Bei genauerer Betrachtung waren in einer anderen Arbeit hauptsächlich die Zellzahlen der Monozyten sowie der neutrophilen Granulozyten erhöht, während die Lymphozytenzahl im Serum und auch die Expression der MHCII-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche erniedrigt war (Huhn et al., 1999). Im Serum

kann durch das IL-10 eine Reduktion der Thrombozyten sowie ein Abfall des Albumins und ein Anstieg des Ferritin induziert werden (Gorski et al. 2000). Größere Nebenwirkungen haben sich bisher in Versuchen an gesunden Probanden nicht gezeigt. Vielmehr konnte darüber hinaus noch eine gute Verträglichkeit der IL-10-Applikation in Kombination mit der Gabe anderer Medikamente wie Prednisolon gezeigt werden (Chakraborty et al. 1999), und auch die Aktivität der Cytochrome in der Leber, die zum Abbau einer Vielzahl von Medikamenten notwendig sind, scheint nicht beeinflusst zu werden (Gorski et al. 2000). Die Nebenwirkungen bei Patienten mit weiteren Grunderkrankungen lassen sich trotz allem nicht abschätzen.

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Beeinflussung der RA haben sich innerhalb der letzten Jahre um die Gruppe der TNF- $\alpha$ -Antagonisten sowie der IL-1RA erweitert. Zu den derzeit klinisch wichtigsten Substanzen gehören das Infliximab, ein chimäres Molekül aus dem konstanten Anteil des humanen IgG und einer murinen variablen Region gegen TNF- $\alpha$ , das Etanercept als humanidentisches TNF-Rezeptor-Fusionsprotein sowie der IL-1 RA Anakinra, der eine kompetitive Inhibition dieses Zytokins am Rezeptor bewirkt. Alle drei Medikamente sind auf der Grundlage vieler Studien bereits für eine Monotherapie der RA insbesondere bei therapierefraktärer Arthritis sowie für eine Kombinationstherapie mit Basistherapeutika wie MTX zugelassen und haben gute Ergebnisse erzielt. So konnte mit dem Etanercept in der Monotherapie bei therapieresistenten Fällen der RA neben einem schnellen Wirkungseintritt eine gute Wirksamkeit erreicht werden (Moreland et al. 1997, 1999). In einer Kombinationstherapie mit MTX konnte für das Etanercept bei Patienten, die auf die Basistherapeutika nicht mehr ansprachen, gegenüber der Placebo-Gruppe und einer Monotherapie mit MTX eine signifikante Verbesserung sowohl der subjektiven Beschwerden als auch der ACR-Kriterien erzielt werden (Weinblatt et al. 1999). Und auch bei Betrachtung von Langzeitergebnissen wurde in einer zweijährigen Studie der Vorteil des Etanercept mit einem deutlich besseren ACR20 von 72 % gegenüber einem ACR20 von 59 % in einer MTX-behandelten Gruppe deutlich (Bathon et al. 2000). Diese neue Substanzgruppe bietet darüber hinaus die Möglichkeit, insbesondere in der Kombinationstherapie die benötigte Dosis der Basistherapeutika sowie zusätzlich applizierter Glucocortikoide zu senken und somit deren erhebliche Nebenwirkungen zu minimieren (Arnheim 2000). Die Nebenwirkungen nach der Applikation von Etanercept oder auch Anakinra fielen relativ gering aus. Für Anakinra konnte eine leicht erhöhte Inzidenz schwerer Infektionen nachgewiesen werden so-

wie für alle Substanzen eine lokale Reizung am Injektionsort. Ein erhöhtes Auftreten von Malignomen oder anderen schwerwiegenden Ereignissen ließ sich bisher nicht nachweisen (Grüthling 2002). Es erscheint folglich als sinnvoll, vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse die Forschung im Bereich der Zytokinblockade als Therapiemöglichkeit der RA auszudehnen.

## 6.7 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden In-vitro-Versuche zeigen, dass eine Klonierung der oben genannten Plasmide erfolgreich war und dass eine Expression von den Plasmiden ausgehend erfolgt. Das EGFP war direkt nachweisbar, während die Interleukine bei allen drei Plasmiden auf der RNA-Ebene detektierbar waren. Allerdings waren die Zytokine mittels ELISA als Proteine nicht nachweisbar – die Ursache dafür könnte die sehr geringe Transfektionsrate der 3T3-Fibroblasten sein, mit denen dieser Versuch durchgeführt wurde.

Eine Transfektion von SCID-Mäusen mit dem Plasmid pCMV- $\beta$  zeigte, dass nach einer i. a.-Injektion von Plasmid-DNA in das Kniegelenk einer naiven Maus das Reportergen bis zu 7 Tage nach der Applikation nachweisbar war. Allerdings erfolgte die Plasmidaufnahme durch Zellen, die in keinem direkten Kontakt zum Kniegelenk stehen. Eine Aufnahme durch synoviale Fibroblasten, wie sie in anderen Studien erfolgt ist, war hier nicht nachweisbar. Dieser Versuch zeigt, dass die Plasmide auch in vivo von Zellen aufgenommen und die darauf kodierten Proteine exprimiert werden können. In einem nächsten Schritt erfolgte die Transfektion von Mäusen, in denen eine AIA ausgelöst wurde. Die Transfektion erfolgte vor Beginn der arthritischen Symptome, da in anderen Arbeiten so eine bessere Wirkung der Zytokinapplikation nachweisbar war. Die Konzentration der injizierten Plasmide pIRES2/EGFP und pIRES2/IL-4/IL-10 war die gleiche wie in den Versuchen mit dem Plasmid pCMV- $\beta$ . Hier konnte allerdings weder während der akuten noch während der chronischen Phase der AIA ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und der mit pIRES2/IL-4/IL-10 behandelten Gruppe festgestellt werden. Die hier untersuchten lokalen und systemischen Parameter zur Beurteilung einer Modulation der Entzündungsreaktion wiesen allerdings auf eine tendenzielle

Verstärkung der entzündlichen Veränderungen im Kniegelenk durch die Gabe des Plasmids pIRES2/IL-4/IL-10 hin.

In diesem Versuch ließ sich somit nicht klären, ob die i. a.-Plasmidapplikation ein geeigneter Weg für einen gentechnischen Therapieansatz der RA ist.

Aufgrund der aus der Literatur bekannten positiven Eigenschaften von Plasmiden, die ihnen einen hohen Stellenwert für die Gentherapie einräumen, sind weiterführende Untersuchungen nötig, um die Wirkung der i. a.-Plasmidapplikation näher zu charakterisieren. Möglicherweise würde eine Wiederholung des Versuches mit höheren Konzentrationen an Plasmid-DNA eindeutiger Ergebnisse erzielen. Weiterhin könnte durch den direkten Nachweis von Plasmid-DNA im Kniegelenk sowie durch den Versuch eines Zytokin-Nachweises aus Gelenkextrakten die Frage geklärt werden, wie lange die Plasmid-DNA im Gelenk verbleibt, bevor sie abgebaut wird, und ob lokal eine therapeutisch bedeutsame Zytokinkonzentration erreicht werden kann. Bei entsprechenden Versuchen wäre allerdings zu bedenken, dass der experimentelle Aufwand sehr hoch ist und sie nur bei entsprechendem wissenschaftlichen und organisatorischen Umfeld durchführbar wären.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abramson SB, Amin A. 2002. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology* 41:972-80.
2. Allen JB. 1993. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *J Immunol* 151:4344-51.
3. Apparailly F, Verwaerde C, Jacquet C, Auriault C, Sany J, Jorgensen C. 1998. Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 160:5213-20.
4. Arai N, Nomura D, Villaret D, de Waal Malefyt R, Seiki M, Yoshida M, Minoshima S, Fukuyama R, Maekawa M, Kudoh J. 1989. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol* 142:274-82.
5. Arend WP, Dayer JM. 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:151-60.
6. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-24.
7. Arnheim K. 2000. Neue Ergebnisse mit Etanercept bei rheumatoider Arthritis. [Beilage] *Rheumatol* 59, 1-6.
8. Auger I, Roudier J. 1997. HLA-DR and the development of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 26:123-8.



9. Barrera P, Faure S, Prud'homme JF, Balsa A, Migliorini P, Chimenti D, Radstake TR, van de Putte LB, Pascual-Salcedo D, Westhovens R, Maenaut K, Alves H, Lopes-Vaz A, Stravopoulos C, Spyropoulou M, Fritz P, Bardin T, Charron D, Lepage V, Alibert, Martinez M, Cornelis F. 2001. European genetic study on rheumatoid arthritis: is there a linkage of the interleukin-1 (IL-1), IL-10 or IL-4 genes to RA? *Clin Exp Rheumatol* 19:709-14.
10. Bathon JM, Martin RW, Fleischman RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, Genovese MC, Wasko MC, Moreland LW, Weaver AL, Markenson J, Finck BK. 2000. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343:1586-93.
11. Bazan JF. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6934-8.
12. Bencsath M, Blaskovits A, Borvendeg J. 2003. Biomolecular Cytokine Therapy. *Pathol Oncology Res* 9:24-9.
13. Bessis N, Doucet C, Cottard V, Douar AM, Firat H, Jorgensen C, Mezzina M, Boissier MC. 2002. Gene therapy for rheumatoid arthritis. *J Gene Med* 4:581-91.
14. Boyle DL, Nguyen KH, Zhuang S, Shi Y, McCormack JE, Chada S, Firestein GS. 1999. Intraarticular IL-4 gene therapy in arthritis: antiinflammatory effect and enhanced th2activity. *Gene Ther* 6:1911-8.
15. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20:841-50.
16. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 41:2196–204.

17. Buchner E, Bräuer R, Schmidt C, Emmerich F, Kinne RW. 1995. Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmun* 8:61-74.
18. Chakraborty A, Blum RA, Mis SM, Cutler DL, Jusko WJ. 1999. Pharmacokinetic and adrenal interactions of IL-10 and prednisone in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 39:624-35.
19. Chan JM, Villareal G, Jin WW, Stepan T, Burstein H, Wahl SM. 2002. Intraarticular gene transfer of TNFR:FC Suppresses experimental arthritis with reduced systemic distribution of the gene product. *Mol Ther* 6:727-36.
20. Chomarat P, Vannier E, Dechanet J, Rissoan MC, Banchereau J, Dinarello CA, Miossec P. 1995. Balance of IL-1 receptor antagonists/IL-1 beta in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 154:1432-9.
21. Chomarat P, Banchereau J. 1997. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8:333-44.
22. Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, Sequeira R, Kent CK, Bacchetta M, Goldman C, Salenius JP, Schmieder FA, Pilsudski R. 2002. Naked Plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* 35:930-6.
23. De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174:915-24.
24. Ding L, Shevach EM. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 148:3133-9.

25. Edwards SW, Hallett MB. 1997. Seeing the wood for trees: The forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 18:320-4.
26. Egsmose C, Lund B, Borg G, Pettersson H, Berg E, Brodin U, Trang L. 1995. Patients with rheumatoid arthritis benefit from early 2nd line therapy: 5 year followup of a prospective double blind placebo controlled study. *J Rheumatol* 22:2208-13.
27. Eskdale J, McNicholl J, Wordsworth P, Jonas B, Huizinga T, Field M, Gallagher G. 1998. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility [letter]. *Lancet* 352:1282-3.
28. Evans CH, Ghivizzani SC, Lechman ER, Mi Z, Jaffurs D, Robbins PD. 1999. Lessons learned from gene transfer approaches. *Arthritis Res* 1:21-4.
29. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-95.
30. Fiorentino DF, Zlotnik A, O'Garra A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815-22.
31. Fuchs AC, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Radwanski E, Affrime MB, Cutler DL, Grint PC, Dinarello CA. 1996. Clinical, hematologic, and immunologic effects of interleukin-10 in humans. *J Clin Immunol* 16:291-303.
32. Gabriel SE. 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27:269-81.
33. Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. 1999. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheum* 42:415-20.

34. Gay S, Gay RE, Koopman WJ. 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 52:39-47.
35. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S. 1994. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 37:1664-71.
36. Gessner A, Rollinghoff M. 2000. Biologic functions and signalling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 201:285-307.
37. Gill DR, Smyth SE, Goddard CA, Pringle IA, Higgins CF, Colledge WH, Hyde SC. 2001. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther* 8:1539-46.
38. Goldring SR. 2003. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 42:1-6.
39. Gorski JC, Hall SD, Becker P, Affrime MB, Cutler DL, Haehner-Daniels B. 2000. In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 67:32-43.
40. Gr  thling A. 2002. Anakinra im klinischen Einsatz. [Beilage] *Rheumatol* 61, 1-4.
41. Hauses M, Schackert HK. 1999. Gene therapy and gastrointestinal cancer: concepts and clinical facts. *Langenbecks Arch Surg* 384:479-88.
42. Hemminki A, Alvarez RD. 2002. Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs* 16:77-87.
43. Huhn RD, Pennline K, Radwanski E, Clarke L, Sabo R, Cutler DL. Effects of single intravenous doses of recombinant human interleukin-10 on subsets of circulating leukocytes in humans. *Immunopharmacology* 41:109-17.

44. Isner JM. 1998. Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv Drug Deliv Rev* 30:185-97.
45. Isaacs A, Lindenmann J. 1987. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 7:429-38.
46. Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen de Roo CJ, Heinegard D, van den Berg WB. 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* 1:81-91.
47. Jorgensen C, Apparailly F, Couret I, Canovas F, Jacquet C, Sany J. 1998. Interleukin-4 and interleukin-10 are chondroprotective and decrease mononuclear cell recruitment in human rheumatoid synovium in vivo. *Immunology* 93:518-23.
48. Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 179:1517-27.
49. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. 1992. Structure of the mouse interleukin-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 148:3618-23.
50. Kim SH, Evans CH, Sunyoung K, Oligino T, Ghivizzani SC, Robins PD. 2000. Gene therapy for established murine collagen-induced arthritis by local and systemic adenovirus-mediated delivery of interleukin-4. *Arthritis Res* 2:293-302.
51. Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmerich F. 1997. T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: villains or accomplices? *Biochim Biophys Acta* 1360:109-41.
52. Khoury AT, Hanafusa H. 1976. Synthesis and integration of viral DNA in chicken cells at different time after infection with various multiplicities of avian oncornavirus. *J Virol* 18:383-400.

53. Kluth DC, Ainslie CV, Pearce WP, Finlay S, Clarke D, Anegon I, Rees AJ. 2001. Macrophages transfected with adenovirus to express IL-4 reduce inflammation in experimental glomerulonephritis. *J Immunol* 166:4728-36.
54. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. 2001. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* 53:241-5.
55. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. 2003. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nature Reviews Cancer* 3:477-88.
56. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. 1999. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 163:1537-44.
57. Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. 1997. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 16:5894-903.
58. Lacraz S, Nicod L. 1992. Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest* 90:382-8.
59. Lacraz S. 1995. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 96:2304-10.
60. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV. 1997. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 24:2314-17.
61. Le J, Vilcek J. 1987. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56:234-48.
62. Lechman RE, Jaffurs D, Ghivizzani SC, Gambotto A, Kovesdi I, Mi Z, Evans CH, Robbins PD. 1999. Direct Adenoviral Gene Transfer of Viral IL-10 to Rabbit

- Knees with Experimental Arthritis Ameliorates Disease in Both Injected and Contralateral Control Knees: J Immunol 163: 2202-8.
63. Lee F, Yokota T, Otsuka T, Meyerson P, Villaret D, Coffman R, Mosmann T, Rennick D, Roehm N, Smith C. 1986. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities. Proc Natl Acad Sci U S A 83:2061-5.
64. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. 1994. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. J Immunol 152:1821-9.
65. Lorenz HM, Kalden JR. 2001. Neue Therapieentwicklungen in der Rheumatoiden Arthritis. Z Rheumatol 60:326-32.
66. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. 1998. Regulatory role of interleukin-10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. Cytokine 10:361-9.
67. Lubberts E, Joosten LA, van den Bersselaar L, Helsen MMA, Bakker AC, van Meurs JBJ, Graham FL, Richards CD, van den Berg WB. 1999. Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. J Immunol 163:4546-56.
68. Lubberts E, Joosten LA, van den Bersselaar L, Helsen MM, Bakker AC, Xing Z, Richards CD, Van Den Berg WB. 2000. Intra-articular IL-10 gene transfer regulates the expression of collagen-induced arthritis (CIA) in the knee and ipsilateral paw. Clin Exp Immunol 120:375-83.
69. Ma Y, Thornton S, Duwel LE, Boivin GP, Giannini EH, Leiden JM, Bluestone JA, Hirsch R. 1998. Inhibition of collagen-induced arthritis in mice by viral IL-10 gene transfer. J Immunol 161:1516-24.

70. Mangan DF, Robertson B, Wahl SM. 1992. IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes. *J Immunol* 148:1812-6.
71. Mentzel K, Bräuer R. 1998. Matrix metalloproteinases, IL-6 and nitric oxid in rat antigen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 16:269-76.
72. Miossec P, Briolay J, Dechanet J, Wijdenes J, Martinez-Valdez H, Banchereau J. 1992. Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 35:874-83.
73. Miossec P, Chomarat P, Dechanet J, Moreau JF, Roux JP, Delmas P, Banchereau J. 1994. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:1715-22.
74. Miossec P, van den Berg WB. 1997. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum* 40:2105-15.
75. Miyata M, Sasajima T, Sato H, Saito A, Irisawa A, Sato Y, Kasukawa R. 2000. Suppression of collagen induced arthritis in mice utilizing plasmid DNA encoding Interleukin 10. *J Immunol* 27:1601-5.
76. Monroe JG, Haldar S, Prystowsky MB, Lammie P. 1988. Lymphokine regulation of inflammatory processes: Interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation. *Clin Immunol Immunopathol* 49:292-8.
77. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248:1230-4.
78. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischman RM, Weaver AL, Ettlinger RE, Cohen S, Koopman WJ, Mohler K, Widmer MB, Blosch CM.



1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-FC fusion protein. *N Engl J Med* 337:141-7.
79. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischman RM, Bulpitt KJ, Weaver AL, Keystone EC, Furst DE, Mease PJ, Ruderman EM, Horwith DA, Arkfeld DG, Garrison L, Burge DJ, Bloch CM, Lange ML, Mc Donnell ND, Weinblatt ME. 1999. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomised, controlled trial. *Ann Intern Med* 130:478-86.
80. Morita Y, Yang J, Gupta R, Shimizu K, Shelden EA, Endres J, Mule JJ, Mc Donagh KT, Fox DA. 2001. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 107:1275-84.
81. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. 1996. Synovial fibroblasts in patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 149:1607-15.
82. Müller-Ladner U, Evans CH, Franklin BN, Roberts CR, Gay RE, Robbins PD, Gay S. 1999. Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 42:490-7.
83. Müller R, Krah T. 1997. Tissue-specific expression of interleukin-4 induces extracellular matrix accumulation and extravasation of B cells. *Lab Invest* 76:117-28.
84. Myllykangas-Luosujarvi RA, Aho K, Isomaki HA. 1995. Death attributed to antirheumatic medication in a nationwide series of 1666 patients with rheumatoid arthritis who have died. *J Rheumatol* 22:2214-7.
85. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual Rev Immunol* 17:701-38.

86. Nita I, Ghivizzani SC, Galea-Lauri J, Bandara G, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH. 1996. Direct gene delivery to Synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 39:820-8.
87. Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, Ochs HD. 1993. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J Exp Med* 178:1097-1102.
88. Oswald IP. 1992. IL-19 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 148:3578-82.
89. Pan RY, Xiao X, Chen SL, Li J, Lin LX, Wang HJ, Tsao XP. 1999. Disease-inducible transgene expression from a recombinant adeno-associated virus vector in a rat arthritis model. *J Virol* 73:3410-7.
90. Paul WE. 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77:1859-70.
91. Petrow PK, Thoss K, Henzgen S, Katenkamp D, Bräuer R. 1996. Limiting dilution analysis of the frequency of autoreactive lymph node cells isolated from mice with antigen-induced arthritis. *J Autoimmun* 9:629-35.
92. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. 1986. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8749-53.
93. Pettipher ER, Blake S. 1995. Antigen-induced arthritis. In: Henderson B, Edwards JCW, Pettipher ER. *Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis*. London: Acad Press, 457-70.
94. Postlethwaite AE, Seyer JM. 1991. Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122. *J Clin Invest* 87:2147-52.

95. Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M. 2000. Post-transcriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 165:292-6.
96. Pritchard MA, Baker E, Whitmore SA, Sutherland GR, Idzerda RL, Park LS, Cosman D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG. 1991. The interleukin-4-receptor gene maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. *Genomics* 10:801-6.
97. Prud'homme GJ. 2000. Gene therapy of autoimmune diseases with vectors encoding regulatory cytokines or inflammatory cytokine inhibitors. *J Gene Med* 2:222-32.
98. Quayle AJ, Chomarat P, Miossec P, Kjeldsen-Krag J, Forre O, Natvig JB. 1993. Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns. *Scand J Immunol* 38:75-82.
99. Raz E, Watanabe A. 1993. Systematic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *National Academy of Sciences* 90:4523-7.
100. Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, Baird SM, Rhodes GH. 1994. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Nat Acad Sci* 91:9519-23.
101. Reilly PA, Cosh JA, Maddison PJ, Rasker JJ, Silman AJ. 1990. Mortality and survival in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective study of 100 patients. *Ann Rheum Dis* 49:363-9.
102. Reynolds PN, Dmitriev I, Curiel DT. 1999. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther* 6:1336-9.

103. Rocklin RE, Chess L, MacDermott RP, Schlossman SF, David JR. 1975. Studies on the production of MIF and mitogenic factor using highly purified human T and B lymphocytes. *Rheumatology* 6:98-105.
104. Ronnelid J, Lysholm J, Engstrom LA, Klareskog L, Heymann B. 1994. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis Rheum* 37:1023-9.
105. Sack U, Kuhn H, Ermann J, Kinne RW, Vogt S, Jungmichel D, Emmerich F. 1994. Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage destruction in knee joints of SCID.bg mice. *J Rheumatol* 21:10-6.
106. Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
107. Seitz M. 1995. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 25:1129-32.
108. Simon J. 2000. *Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T-Helfer-Zellen bei der Antigen-induzierten Arthritis [Dissertation]*. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
109. Sprang SR, Bazan JF. 1993. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr Opin Struct Biol* 3:815-27.
110. Syto R, Murgolo NJ, Braswell EH, Mui P, Huang E, Windsor WT. 1998. Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. *Biochemistry (Mosc)* 37:16943-51.
111. Tak PP, Bresnihan B. 2000. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum* 43:2619-33.

112. Tan JC, Indelicato S, Narula SK, Zavodny PF, Chou CC. 1993. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J Biol Chem* 268:21053-9.
113. Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. 2000. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* 165:286-91.
114. van de Loo FAJ, van den Berg WB. 2002. Gene therapy for rheumatoid arthritis: lessons from animal models, including Interleukin-4, Interleukin-10, and Interleukin-1 receptor antagonists as potential disease modulators. *Rheum Dis Clin Nor Am* 28:127-49.
115. van der Heide A, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, van der Veen MJ, Haanen HC, Hofman DM. 1996. The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 124:699-707.
116. van Jaarsveld CH, Jacobs JW, van der Veen MJ, Blaauw AA, Kruize AA, Hofman DM, Brus HL, van Albada-Kuipers GA, Heurkens AH, ter Borg EJ, Haanen HC, van Booma-Frankfort C, Schenk Y, Bijlsma JW. 2000. Aggressive treatment in early rheumatoid arthritis: a randomised controlled trial. On behalf of the Rheumatic Research Foundation Utrecht, The Netherlands. *Ann Rheum Dis* 59:468-77.
117. Vilcek J, Le J. 1991. Immunology of Cytokines: An Introduction. In: Thomson AW, Hrsg. *The Cytokine Handbook*. 3. Aufl. London: Acad Press, 1-9.
118. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischman RM, Fox RI, Jackson CG, Lange M, Burge DJ. 1999. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 340:253-9.
119. Weisman MH, Moreland LW, Furst DE, Weinblatt ME, Keystone EC, Paulus HE, Teoh LS, Velagapudi RB, Noertersheuser PA, Granneman GR, Fischkoff SA,

- Chartash EK. 2003. Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther* 25:1700-21.
120. Whalen JD, Lechmann EL, Carlos CA, Weiss K, Kovesdi I, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH. 1999. Adenoviral Transfer of the Viral IL-10 Gene Periarticularly to Mouse Paws Suppresses Development of Collagen-Induced Arthritis in Both Injected and Uninjected Paws. *J Immunol* 162:3625-32.
121. Wilske KR, Healey LA. 1989. Remodeling the pyramid – a concept whose time has come. *J Rheumatol* 16:565-7.
122. Wolfe F, Hawley DJ, Cathey MA. 1990. Termination of slow acting antirheumatic therapy in rheumatoid arthritis: a 14-year prospective evaluation of 1017 consecutive starts. *J Rheumatol* 17:994-1002.
123. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-8.
124. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. 1992. Long-term persistence of Plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1:363-9.
125. Woods JM. 2001. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, pro-inflammatory cytokines, vascularization and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol* 166:1214-22.
126. Xing Z, Ohkawara Y, Jordana M, Graham FL, Gauldie J. 1997. Adenoviral vector-mediated interleukin-10 expression in vivo: intramuscular gene transfer inhibits cytokine responses in endotoxemia. *Gene Ther* 4:140-9.
127. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B. 1994. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 53:39-44.

128. Yovandich J, O'Malley B Jr, Sikes M, Ledley FD. 1995. Gene transfer to synovial cells by intraarticular administration of plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 6:603-10.
129. Zanelli E, Gonzalez-Gay MA, David CS. 1995. Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis? *Immunol Today* 16:274-8.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:  
PD Dr. Andreas Henke, Dr. Marion Hückel, Prof. Dr. Rolf Bräuer,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 3. Juni 2004

Stefanie Knackstedt, Verfasserin



## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Virologie und antivirale Therapie sowie am Institut für Pathologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena erstellt. Ich möchte allen meinen Dank aussprechen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

An dieser Stelle danke ich insbesondere Herrn PD Dr. Andreas Henke für die individuelle und intensive Betreuung während der experimentellen Arbeiten sowie beim Schreiben dieser Arbeit. Der gesamten Arbeitsgruppe von Dr. Henke, die eine sehr freundliche Atmosphäre geschaffen hat, und bei der ich immer ein offenes Ohr und Hilfe fand, möchte ich ein riesiges Dankeschön aussprechen.

Die Arbeiten am Institut für Pathologie wurden von Dr. Marion Hückel betreut, der ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der In-vivo-Versuche herzlich danken möchte.

Für die Vergabe eines Stipendiums, mit dessen Hilfe ich ein Jahr lang mein Studium für die experimentellen Arbeiten unterbrechen konnte, bedanke ich mich insbesondere beim Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie bei dem Stifter des Stipendiums, der Carl Zeiss Jena GmbH.

Last but not least gilt mein Dank natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die während der gesamten Zeit meiner Arbeiten immer für mich da waren, tapfer Korrektur gelesen haben und viel Geduld mit mir bewiesen haben.

# Lebenslauf

**Persönliche Daten:** Stefanie Knackstedt  
Studentin der Humanmedizin  
geboren am 05. Januar 1979 in Braunschweig  
ledig, keine Kinder

## **Schullaufbahn:**

07/1985 - 07/1989 Grundschole Woltwiesche  
07/1989 - 07/1991 Orientierungstufe Lengede  
07/1991 - 07/1998 Gymnasium Groß Ilsede  
07/1998 Allgemeine Hochschulreife

## **Studium:**

10/1998 Beginn des Medizinstudiums an der FSU Jena  
09/2000 Ärztliche Vorprüfung  
09/2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2002 - 04/2003 2. Urlaubssemester zur Durchführung der experimentellen Arbeiten der Promotion, gefördert durch ein Stipendium der Carl Zeiss Jena GmbH  
09/2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2004 - 09/2005 Praktisches Jahr  
12/2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Studienabschluß

## **Praktisches Jahr:**

Innere Medizin: 3. Medizinische Klinik (Kardiologie und kardiologisch-internistische Intensivmedizin), Helios Klinikum, Erfurt  
Neurologie: Klinik für Neurologie, Helios Klinikum, Erfurt  
Chirurgie: Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, St. Johann Nepomuk, Erfurt

## **Dissertation:**

„Therapie der experimentellen Arthritis mittels Plasmid-Inokulation“

Experimentelle Arbeit am Institut für Virologie und antivirale Therapie bei Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Henke in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Ralf Bräuer am Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Lengede, 20. Dezember 2005